FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1966

THÈSE 365

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ETAT

PAR

Bernard PEJSACHOWICZ

né le 21 septembre 1935 à Paris (10e)

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

LE PHENOMENE D'AGREGATION CELLULAIRE.

SA SIGNIFICATION BIOLOGIQUE.

Président : Monsieur J. BERNARD, Professeur.

EDITIONS A.G.E.M.P. — 8, RUE DANTE · PARIS-Ve

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

THÈSE

Année 1966 POUR LE N°

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ETAT

PAR

Bernard PEJSACHOWICZ

né le 21 septembre 1935 à Paris (10e)

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

LE PHENOMENE D'AGREGATION CELLULAIRE.

SA SIGNIFICATION BIOLOGIQUE.

Président : Monsieur J. BERNARD, Professeur.

EDITIONS A.G.E.M.P. — 8, RUE DANTE - PARIS-Ve

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

1/1/1966

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN . . . . . Georges BROUET.

1er ASSESSEUR . . . . . Daniel BARGETON

2e ASSESSEUR . . . . . Jean GOSSET

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
—	POLONOVSKI (J.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
—	DOGNON (A.)
—	DJOURNO (A.)
Cancérologie médicale et sociale	DENOIX (P.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
—	KUSS (R.)
—	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
—	BRICAIRE (H.)
—	PÉQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	N...
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
—	LEVY (Mlle J.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)

	MM.
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	NEZELOF (Ch.)
Bactériologie	BARBIER (P.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.) DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Histologie	COUJARD (R.)
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale	LOEPER (J.) RICHET (G.)
Physiologie	DEJOURS (P.) ROUGAYROL (J.-Cl.) SCHERRER (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.) GOUGEROT (L.) TUBIANA (M.)
Radiologie médicale	FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

		MM.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)		SOULIÉ (P.)
— — (Boucicaut)		LENÈGRE (J.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	—	N...
	Cochin	LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)		MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
— — — (Foch)		PADOVANI (P.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)		FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)		DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)		MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)		DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)		DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)		LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)		HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)		DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)		TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)		MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)		DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)		HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)		BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)		CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales	Bicêtre	DEPARIS (M.)
	Broussais	MILLIEZ (P.)
	Cochin	BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu	BARIÉTY (M.)
	Laribolsière	SÈZE (S. de)
	Pitié	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
	Saint-Antoine	BOUDIN (G.)

	MM.
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales — Baudelocque	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales — Saint-Antoine	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G.)
— — (Cochin)	BREGEAT (P.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie	MOZZICONACCI (P.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)	JUDET (R.)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P.)
— — (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	LAPLANE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)	DOMART (A.)
— — (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y.)
— — (Pitié)	RAMBERT (P.)
— — (Rothschild)	WOLFROMM (R.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	POILLEUX (F.)

b) Professeurs à titre personnel :

Hématologie	ANDRÉ (R.)
	BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
Médecine	AZERAD (E.)
	BOUR (H.)
	CABROL (Ch.)
	GROSSIORD (A.)
	LAMBLING (A.)
	LAUNAY (Cl.)
	PAYET (M.)
	PERRAULT (M.)
	SIGUIER (F
	WORMS (R.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE F.
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
Pédiatrie	POLONOVSKI (Cl.)
	ROYER (P.)
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B.)
	MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM.
Anatomie pathologique	BOUYSOU (Ch.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.) GONNARD (P.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)
Hématologie	BILSKI-PASQUIER (G.)
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Physique médicale	COURSAGET (J.) GREMY (F.)
Physiologie	GIRARD (Fr.)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.)

III. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

IV. — PROFESSEUR ASSOCIÉ

Statistique médicale et épidémiologique	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseillers administratifs	Mlle CHAINTREUIL (G.) M. FAYE (R.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque. Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.),
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), Dr SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A ma Mère,

à la mémoire de qui ce travail est dédié,

A mon Père,

A ma Marraine,

A mon Parrain.

A Monsieur le Professeur Bernard HALPERN

Membre de l'Institut,

Professeur au Collège de France,

Officier de la Légion d'Honneur,

Qui m'a initié au travail et aux joies de la recherche et m'a inspiré le sujet de cette thèse.
Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde admiration.

A Monsieur le Professeur Jean BERNARD

Professeur de Clinique des Maladies du Sang

à la Faculté de Médecine de Paris,

Médecin de l'Hôpital SAINT-LOUIS

Commandeur de la Légion d'Honneur

Qui m'a fait le grand honneur d'accepter

la présidence de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Daniel CHRISTOL

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

Biologiste de l'Hôpital CLAUDE BERNARD

dont la bienveillance nous a permis l'achèvement de cette thèse, au cours de l'année d'internat que nous avons eu le privilège de passer dans son service.

Au Docteur Henri-Lucien FEBVRE

Maître de Recherches au C.N.R.S.

Chef du Service de Cytobiologie de l'Institut de Recherches sur le Cancer.

Directeur du Groupe de Biologie Cellulaire et de Culture de Tissus de l'I.N.S.E.R.M.

Qui m'a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire et m'a enseigné avec patience la biologie cellulaire.

Au Docteur Georges BARSKI

Directeur du Laboratoire de Culture de Tissus

de l'Institut Gustave Roussy

Qui m'a apporté une aide précieuse.

A mes Maîtres dans les Hôpitaux :

Monsieur le Professeur J. MATHEY

Monsieur le Professeur M. DEPARIS

Monsieur le Docteur A. LAPORTE

Monsieur le Professeur R. BASTIN

Monsieur le Docteur M. BOLGERT

Monsieur le Professeur E. BERNARD

Monsieur le Docteur L. ISRAEL

Monsieur le Docteur A. GERBAUX

Monsieur le Docteur J.L. BEAUMONT

Monsieur le Docteur R. TOURNEUR

Monsieur le Professeur F. COSTE

Monsieur le Professeur F. DELBARRE.

A Monsieur le Professeur C. LAROCHE

A Monsieur le Docteur A. NENNA.

A tout le personnel du Laboratoire de Cytobiologie
de l'Institut de Recherches sur le Cancer.

A tout le Personnel du Laboratoire de Virologie
de l'Hôpital CLAUDE BERNARD.

Qu'il trouve ici l'expression de mon très sincère remerciement pour sa gentillesse et son dévouement.

A Madame le Docteur Y. PEROL
Chef de Travaux à la Faculté

Qui m'a si aimablement accueilli dans son laboratoire.

- P L A N -

CHAPITRE I : INTRODUCTION - HISTORIQUE.

I. DEFINITION
II. HISTORIQUE.
III. INTERET DU PHENOMENE.

CHAPITRE II : LES FACTEURS DE L'AGREGATION DES CELLULES EMBRYONNAIRES.

I. GENERALITES.
II. L'AGREGATION SPONTANEE.
III. L'AGREGATION CONTROLEE.

I. GENERALITES.
II. LES PRINCIPAUX PARAMETRES DE L'AGREGATION DES CELLULES EMBRYONNAIRES.

A - Les facteurs cellulaires.
B - Les facteurs du milieu
C - Les facteurs extérieurs.
D - Les facteurs immunologiques.

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT ET STRUCTURE DES AGREGATS EMBRYONNAIRES.

I. GENERALITES.
II. DEVELOPPEMENT DES AGREGATS.

CHAPITRE IV : L'AGREGATION DES CELLULES NEOPLASIQUES DES MAMMIFERES CULTIVEES "IN VITRO".

I. GENRALITES.
II. L'AGRAGATION DE CELLULES DE MAMMIFERES EN LIGNEES CONTINUES.
III. TRAVAUX PERSONNELS.

A - Choix des cellules.
B - Matériel et méthodes.
C - Résultats.
D - Les facteurs de l'agrégation des cellules néoplasiques.

E - Histologie et ultra-structure.

CHAPITRE V - MECANISMES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AGREGATION .

I. LA MEMBRANE CELLULAIRE.

II. TRAVAUX PERSONNELS.

CHAPITRE VI - FAITS ET HYPOTHESES SUR LE PHENOMENE D'AGREGATION CELLULAIRE. RELATIONS AVEC LE POTENTIEL DE MALIGNITE.

I. GENERALITES.

II. FACTEURS MICROBIENS ET VIRAUX.

III. ADHERENCE INTERCELLULAIRE ET ADHESIVITE AUX SUBSTRATS.

IV. LA STRUCTURE DE L'AGREGAT ET LES CONDITIONS DE L'AGREGATION..

V. FACTEURS DE L'ADHERENCE INTERCELLULAIRE.

VI. AGREGATION CELLULAIRE ET MALIGNITE.

VII. ANOMALIES BIOCHIMIQUES DES CELLULES MALIGNES ET AGREGATION.

VIII. AGREGATION ET INHIBITION DE CONTACT.

IX. AGREGATION ET IDENTIFICATION DES CELLULES NEOPLASIQUES.

X. AGREGAT ET BIOLOGIE TUMORALE.

CHAPITRE I - INTRODUCTION. HISTORIQUE.

I - DEFINITION :

L'agrégation cellulaire est la recombinaison de cellules préalablement dissociées. Dans des conditions convenables, ces cellules réassociées forment une structure cohésive, l'agrégat.

L'agrégation cellulaire peut être spontanée ou facilitée par l'agitation des cultures.

Ce phénomène est limité à un certain nombre de types cellulaires, dont les cellules d'embryons jeunes et certaines lignées de cellules maintenues en cultures in vitro.

L'agrégation est donc la mise en évidence de propriétés d'adhérence mutuelle que possèdent certaines cellules.

II - HISTORIQUE :

On sait depuis W. ROUX (1) et H.W. WILSON (2) que les cellules d'une éponge dissociées par passage à travers les fines mailles d'un tissu de soie, se réassocient spontanément, et que les agrégats ainsi obtenus reconstituent des éponges fonctionnelles. La nature de ce phénomène resta longtemps discutée, WILSON croyait à une dédifférenciation puis redifférenciation cellulaire, tandis que

d'autres pensaient à un réassortiment, chaque type cellulaire reprenant la place qu'il occupait antérieurement ; les deux hypothèses ne pouvaient être départagées faute d'un "marqueur" permanent et reconnaissable.

Puis HOLTEFRETER (3), dans ses études classiques sur la gastrulation des amphibiens, montra que les fragments des divers tissus des embryons d'Amphibiens avaient une adhésivité mutuelle qui variait selon leur origine. Il mit également en évidence le rôle du pH et des ions bivalents dans la dissociation et la réassociation des cellules embryonnaires et surtout la réalité du mouvement des cellules, conduisant à un "assortiment" dû aux affinités des cellules elles-mêmes.

Enfin A.A.MOSCONA (4) ouvrit une nouvelle voie en montrant que les cellules d'embryons d'oiseaux relativement plus âgés pouvaient être dissociées par la trypsine. Différents auteurs (dont P. WEISS) (5),ASG. CURTIS (6), TRINKAUS (7) montrèrent que les cellules d'embryons d'oiseaux et de mammifères ainsi dissociées pouvaient s'agréger, former des structures multicellulaires ressemblant à un tissu, ces agrégats étant capables de se développer et de se différencier en fonction de nombreux facteurs (dont la nature des cellules et leur compétence histo-typique).

En 1957 (11), MOSCONA et en 1959 (104) DABROWSKA décrivirent pour la première fois l'agrégation de cellules dissociées à partir de tumeurs spontanées ou expérimentales de la souris. Mais ils n'ont pas comparé des cellules normales issues de tissus identiques. En 1957 LEIGHTON (8) et en 1963 MOSCOWITZ (9) décrivent l'agrégation de cellules maintenues en culture in vitro et formant des lignées. Ces cellules provenaient de tissus de mammifères et de tissus humains. Mais la malignité des cellules, lors de l'agrégation, n'est pas précisée.

III - INTERET DU PHENOMENE :

a) L'agrégation permet de sélectionner dans une population cellulaire les éléments les plus cohésifs. Elle donne la possibilité de différencier les cellules en fonction de leur adhérence mutuelle.

b) L'agrégat ainsi formé de cellules plus ou moins cohésives, a une structure qu'il est possible d'étudier par l'histologie et la microscopie électronique. Dans le cas d'agrégats de cellules embryonnaires, on étudie la différenciation des cellules (à l'intérieur de l'agrégat) vers un tissu ou un organe. La combinaison de cellules de tissus (homo ou hétéro-typiques) provenant d'espèces animales différentes permet l'étude des affinités de tissu, d'organes ou d'espèces.

c) Les rapports de l'agrégation cellulaire et de la malignité peuvent être précisés.

d) Ainsi le phénomène d'agrégation cellulaire mène à des études au niveau cellulaire et moléculaire, des processus et des fonctions impliqués dans l'attachement mutuel des cellules.

La "culture des cellules" et la "culture d'organes" étudient in vitro les propriétés des cellules dispersées et des fragments de tissus.

La méthodologie de l'agrégation cellulaire s'applique à la transition de l'uni à la multicellularité : elle cherche à définir les différences dans le comportement des cellules séparées par rapport aux groupes de cellules et à déterminer les facteurs variés extrinsèques et intrinsèques à la cellule, qui affectent la constitution de groupements cellulaires.

Enfin, si l'agrégation est traitée ici comme une discipline expérimentale pour l'étude de la dynamique cellulaire dans des conditions re-

lativement simplifiées : il faut rappeler qu'elle représente un évènement normal dans le cycle de nombreux micro-organismes, en particulier les bactéries et les protozoaires et que des processus normaux de dissociation et d'agrégation apparaissent continuellement au cours du développement, de la cicatrisation , de divers processus pathologiques, en particulier la croissance , l'invasion et les métastases tumorales.

- CHAPITRE II -

LES FACTEURS DE L'AGREGATION DES CELLULES EMBRYONNAIRES.

I - GENERALITES.

Nous n'étudierons dans ce chapître que l'agrégation des cellules des embryons d'Oiseaux et de Mammifères, essentiellement à la lumière des données de la littérature.

C'est au cours de ces travaux que l'agrégation cellulaire a été étudiée de la façon la plus exhaustive et que divers problèmes d'intérêt général ont été résolus : techniques de dissociation, d'agrégation ; mécanisme et signification des phénomènes.

Les premiers travaux d'EBELING et FISCHER (10) utilisaient des cellules qui avaient migré à partir d'explants tissulaires : des cultures sur plasma de fibroblastes et de cellules épithéliales étaient placées côte-à-côte, de façon à ce que les cellules se rapprochent ; dans la zone de rencontre, se produisait l'agrégation des cellules épithéliales avec pour résultat la formation de structures tubulaires entourées par un stroma mésenchymateux.

Un progrès important fut accompli par l'utilisation de suspensions de cellules complètement dispersées et par l'étude de leur réassociation en agrégats.

La dissociation cellulaire est obtenue :

. soit par l'action de solutions sans calcium ni magnésium,

contenant ou non un chélateur (EDTA).

.l'une de ces techniques pouvant s'ajouter à une dissociation mécanique.

L'agrégation de cellules dissociées peut-être étudiée de deux manières :

. L'auto-agrégation ou agrégation spontanée (qui a lieu en culture stationnaire, c'est-à-dire dans dans des flacons de culture).

.L'agrégation contrôlée dans laquelle les cellules en suspension sont concentrées et amenées au contact l'une de l'autre par une rotation continue à basse vitesse.

II - L'AGREGATION SPONTANEE.

A) A été étudiée essentiellement en culture stationnaire lorsqu'on laisse sédimenter (dans un milieu de culture liquide), des cellules embryonnaires dispersées, et si elles sont douées d'adhérence mutuelle, on les voit s'agglomérer alors qu'elles sont encore en suspension, et continuer à s'agréger sur le fond du flacon de culture (MOSCONA) (11).

Des films cinématographiques ont montré qu'il se forme d'abord de nombreuses grappes de cellules, lâchement liées et que les grappes s'accroissent secondairement par accrétion de nouvelles cellules et par fusion. Les collisions au hasard des migrations sur le substrat, la contraction des connections intercellulaires contribuent au recrutement des cellules par les agrégats.

L'incorporation des cellules par les agrégats n'est pas égale. Certains atteignent rapidement des dimensions notables, alors que d'autres restent petits et peuvent même se redisperser. Seule une partie des cellules vivantes et morphologiquement intactes s'incorpore dans les agrégats. Les

cellules qui restent isolées - ou bien étaient incapables de s'agréger après leur dissociation, ou perdent progressivement leur capacité de s'agréger. Ainsi l'agrégation spontanée en culture stationnaire permet de faire une discrimination entre deux types de cellules dans une population apparemment homogène, en séparant les cellules adhésives des cellules qui ne le sont pas.

B) Mais cette technique est très critiquable : le nombre, le taux de formation, la taille, la composition des agrégats sont très variables ; il est difficile de parler de comportement typique des cellules lors de l'agrégation et de comparer les résultats.

En effet, l'agrégation spontanée reflète l'interaction mutuelle de facteurs dépendant des cellules d'une part, de leur environnement d'autre part. Elle est affectée par :

- le nombre et la mobilité des cellules,

- la nature du substrat sur lequel les cellules migrent et que modifie "leur inhibition de contact". (ABERCOMBRIE)(1961) (12).

- la composition du milieu de culture : par exemple (A.C. TAYLOR 1961) (13), le sérum animal retarde l'adhésion des cellules au verre, le cholestérol et les lipoprotéines (RUTSTEIN et collab. 1958) (14) modifient l'apparence et le comportement des cellules.

- les conditions de l'interzone du milieu et du substrat d'une façon générale, qui affecte de façon considérable l'attachement et le mouvement cellulaire et donc l'agrégation (GARBER 1953 (15), P. WEISS (16), EARLE 1962,(17)).

- les cellules elles-mêmes contribuent à l'interzone dans laquelle elles fonctionnent.

En effet, de nombreux auteurs (L.WEISS 1961,(18), MOSCONA 1960 (19), AMBROSE et JONES 1961 (20)) ont décrit des exsudats et différents matériaux déposés par les cellules, ainsi qu'un espace cellules-substrat probablement rempli par le matériel. Les caractéristiques des dépôts cellulaires sont très variables influencées par le pH, la concentration ionique, la température.

Le matériel extra-cellulaire peut, en outre "guider des migrations cellulaires" ou même leur fournir une "information".

Ainsi pour une étude de la dynamique du contact cellulaire, il est préférable d'utiliser des systèmes expérimentaux où les cellules sont rassemblées indépendamment de leur mobilité individuelle et dans des conditions contrôlables et mesurables.

III - L'AGREGATION CONTROLEE.

I. GENERALITES.

Dans l'agrégation par rotation, les cellules dispersées sont assemblées en faisant tourner avec douceur les suspensions dans des fioles d'ERLENMEYER sur un agitateur giratoire. Le "flux tournant" du liquide assure une haute fréquence de rencontres au hasard, sans que les cellules soient rassemblées de force (comme dans l'agrégation par centrifugation).

Les cellules ne forment d'agrégats que si elles sont mutuellement adhésives. Elles s'agglomèrent tout d'abord en petits amas qui augmentent par accrétion jusqu'à atteindre une taille et une forme caractéristique d'une population cellulaire et de paramètres donnés. Les cellules et les agrégats restent en suspension permanente ; leurs rencontres et leurs contacts sont donc

très indépendants des capacités de migration des cellules et des facteurs qui peuvent les affecter. De plus, tous les paramètres intéressants du processus peuvent être facilement contrôlés et standardisés. Les résultats sont donc reproductibles et le système permet des études quantitatives sur les intéractions cellulaires. La formation des agrégats par rotation reflète l'action combinée de :

a) le flux concentrique du milieu qui tend à balayer les cellules et les agrégats naissants dans le vortex, à augmenter la fréquence des rencontres et donc à promouvoir l'agrégation.

b) les forces de dispersion qui tendent à séparer et disperser les cellules, réduisant le taux des collisions.

c) L'adhésivité mutuelle des cellules, dans des conditions données.

a et b sont liés à la vitesse de rotation, a diminuant et b augmentant aux vitesses élevées.

Pour une vitesse de rotation donnée, les seules cellules qui forment des agrégats sont celles qui, après contact mutuel, s'attachent de façon suffisamment forte pour résister aux forces de dispersion à cette vitesse.

Le nombre et la taille des agrégats représentent donc la réponse d'une population cellulaire en termes d'adhésivité différentielle, en fonction des forces et des conditions appliquées. Ainsi, dans un ensemble de conditions optimales, une population de cellules hautement adhésives s'agrège en une masse unique comprenant presque toutes les cellules, et dans les mêmes conditions une population consistant essentiellement en cellules peu adhésives restent libres.

Alors que les cellules s'agrégent :

a) Il y a une diminution progressive du nombre de toutes les particules, accompagnée d'une augmentation de leur taille moyenne.

b) un arrangement des cellules dans les agrégats en croissance qui peut affecter leur capacité de recrutement ultérieur (par exemple les agrégats qui acquièrent une bordure de cellules non adhésives n'incorporent plus de cellules nouvelles et ne fusionnent pas).

Mais si la numération et la mesure du diamètre des agrégats sont la technique la plus couramment utilisée pour chiffrer l'agrégation cellulaire, il ne s'agit que d'une estimation relativement grossière et surtout tardive qui ne tient compte que d'agrégats déjà volumineux. Aussi CURTIS (21) (1965) pense résoudre ce problème en traitant l'agrégation comme un système de floculation ortho-cinétique. Il mesure l'agrégation en comptant le nombre des cellules libres après 16 heures d'agitation et en le comparant au nombre initial de cellules.

II - LES PRINCIPAUX PARAMETRES DE L'AGREGATION DES CELLULES EMBRYONNAIRES.

A) Les facteurs cellulaires de l'agrégation par rotation sont essentiellement au nombre de deux :

- le tissu d'origine
- l'âge de l'embryon, c'est-à-dire son stade de développement.

1°) Les cellules des différents tissus d'un même embryon diffèrent dans leurs possibilités d'agrégation et elles forment des agrégats dont l'aspect est spécifique du tissu ou des cellules en question ; les traits principaux des agrégats sont apparus en général en 24 heures. En effet, à ce moment, ils acquièrent une couche de cellules externes relativement non adhé-

sives, et leur accroissement ultérieur et donc leur changement de forme vient plus de la croissance cellulaire que d'une fusion d'agrégats, cependant possibles. Par exemple, une population cellulaire comprenant en grande partie des cellules peu adhérentes donne des agrégats nombreux mais petits : c'est le cas des cellules des bourgeons de membres qui produisent des agrégats rapide ment recouverts de cellules épidermiques très peu adhérentes.

A l'inverse, les cellules hépatiques, dans les mêmes conditions donnent un très gros agrégat unique. Il est intéressant de noter que ces différentes figures d'agrégation ne sont pas spécifiques de l'espèce animale, mais du tissu : les cellules homologues d'embryons de souris ou de poulet ayant le même comportement (MOSCONA 1961). (22).

2°) Le deuxième facteur cellulaire important est le stade de développement des cellules, c'est-à-dire leur état de différenciation. Le fait fondamental est que les cellules d'un même tissu, mais provenant d'embryons de plus en plus âgés, montrent une diminution progressive de leurs propriétés d'agrégation , les agrégats formés étant de plus en plus petits et les cellules libres de plus en plus nombreuses. Les cellules d'un animal adulte normal ne forment pratiquement pas d'agrégats. Ces faits ont été retrouvés chez le poulet (cellules rétiniennes et hépatiques). Cette diminution de l'adhésivité liée à l'âge rappelle un phénomène qui apparaît normalement dans le développement du thymus, des ganglions lymphatiques, de la moëlle osseuse (AUERBACH 1961) (23). La cause précise de la relation entre l'agrégation cellulaire et l'âge de l'embryon est inconnue.

- On pourrait invoquer une altération cellulaire lors de la dissociation , mais cela paraît peu probable car ces cellules se développent

très bien en cultures stationnaires.

-Il semble plus probable que cet effet est lié à une spécialisation progressive des cellules avec le développement embryonnaire s'accompagnant de restrictions et de canalisations des fonctions métaboliques (MOSCONA 1964) (24). En effet, la formation des agrégats semble dépendre de la possibilité qu'ont les cellules de fabriquer des produits spécifiques de leur surface qui ont été enlevés par la dissociation. Le fait que les cellules différenciées ne peuvent s'agréger pourrait signifier que leurs activités de biosynthèse sont très spécifiques et incapables de dégénérer complètement le matériel de surface.

La possibilité d'une relation significative entre l'état fonctionnel des cellules et leurs propriétés adhésives est suggérée par les études faites sur les cellules embryonnaires cultivées en couches monocellulaires. C'est ainsi que MOSCONA en 1960 (19), KURODA 1963 (25) ont montré que différents types cellulaires, après culture stationnaire, avaient une capacité d'agrégation qui diminuait progressivement et rapidement avec le temps de culture : des cellules de cartilage d'un embryon de poulet de 13 jours qui forment après dissociation 1 ou 2 gros agrégats restent isolées lorsqu'on essaie de les agréger après 6 jours de culture.

Il est possible que ces changements dans les propriétés adhésives des cellules après culture stationnaire soient dus à des altérations de la surface cellulaire ou des produits de la sécrétion de ces cellules ; par exemple on a noté une différence des mucopolysaccharides extracellulaires selon que les cellules avaient été cultivées en contact ou dispersées (26) (27)
Les changements de l'antigénicité des cellules cultivées et l'augmentation

de leur susceptibilité à l'infection virale (ENDERS 1949,(28), HOLLAND 1961, (29)) s'expliquent peut-être de cette façon.

B) Les facteurs du milieu.

Le milieu de culture est composé :

1°) D'un milieu synthétique , type EAGLE (30)

2°) Parfois d'un extrait embryonnaire homologue ou hétérologue.

3°) Ce milieu est toujours enrichi par un sérum animal qui semble indispensable à la réagrégation des cellules embryonnaires dissociées par la trypsine et cultivées dans un milieu en équilibre salin et ionique.

Trois mécanismes sont possibles pour expliquer la nécessité du sérum.

- inactivation des traces de trypsine
- formation d'un environnement macromoléculaire protégeant les cellules.
- enfin satisfaction des besoins métaboliques qui peuvent affecter l'agrégation.

Cette activité des protéines sériques ne peut être remplacée,
- ni par dialysats sériques
- ni par des colloïdes tels que le méthyl-cellulose ou le polyvinylpyrridone
- cependant certaines fractions sériques peuvent remplacer le sérum total : une alpha-lipo-protéine extraite du sérum de boeuf et la fétuine (FISCHER 1958) (31), mais à des concentrations élevées. L'identification précise du ou des facteurs indispensables dans ces fractions n'est pas faite. Il

est à remarquer que leur composition est proche de celle de la membrane plasmatique cellulaire (WILLMER 1961) (32). Cependant dans une publication très récente, MOSCONA, A. et MOSCONA A.H. (33) ont montré que l'agrégation des cellules embryonnaires était possible en l'absence de sérum ou de fractions sériques.

4°) Les ions divalents (surtout le calcium et le magnésium) sont également nécessaires à l'agrégation des cellules embryonnaires. Ces ions sont présents essentiellement dans le milieu synthétique et l'extrait embryonnaire, seulement à l'état de trace dans le sérum. La quantité réelle indispensable est inconnue.

C) Les facteurs extérieurs .

1°) La vitesse de rotation est un facteur essentiel du contrôle de la taille de l'agrégat et de leur pourcentage par rapport aux cellules libres. Toutes choses étant égales par ailleurs à des vitesses de rotation élevées, les forces de dispersion sont plus grandes et la fréquence des collisions cellulaires plus basse, d'où une diminution de la taille et du nombre des agrégats et une augmentation des cellules libres. Ainsi une suspension de cellules de foie d'embryon de poulet s'agrège en une masse unique en 24 heures à 38° et à 70 tours/minute, sans laisser de cellules libres, alors qu'à 85 tours, il se forme de nombreux agrégats plus petits ; à des vitesses encore plus élevées, la taille des agrégats diminue, et le nombre des cellules libres augmente ; à 120 tours il n'y a pratiquement plus d'agrégats. Les cellules qui sont capables de s'agréger à cette vitesse représentent la fraction la plus adhésive de la population. Il est donc possible, en testant des fractions de la même suspension à des vitesses différentes et en recueillant les agrégats

au moment voulu, de la fractionner en tranches de cellules "d'adhésivité différentielle".

2°) La température exerce un contrôle fondamental sur l'agrégation cellulaire. A des température inférieures à la température optimale, la formation des groupes cellulaires diminue rapidement. A 25° (alors que la température optimale est de 38°) et à 70 tours/minute, les cellules hépatiques d'un embryon de poulet de 7 jours forment des amas amorphes et très peu cohérents, les cellules rétiniennes de très petits agrégats et il reste de nombreuses cellules libres.

A 15° l'agrégation est totalement inhibée mais si on élève la température à 38° l'agrégation réapparaît.

L'importance de la température dans l'agrégation des cellules embryonnaires dissociées fait penser que des processus thermo-sensibles et probablement métaboliques sont nécessaires à la recohésion des cellules. En effet, le milieu de culture contient en quantité suffisante les ions Ca et Mg. Donc si les ions étaient suffisants à eux seuls au réattachement cellulaire, l'agrégation ne devrait pas être inhibée à 15° (contrairement aux affirmations de CURTIS 1960 (34), STEINBERG 1958 (35)), car la formation des ponts Ca ne peut pas être supprimée aux basses températures.

D) Des facteurs immunologiques jouent également un rôle dans l'agrégation des cellules embryonnaires.

MOSCONA (1962) (36) a montré qu'un sérum de lapin (décomplémenté) contre des cellules hépatiques d'un embryon de poulet de 7 jours inhibe la formation d'agrégats par des cellules hépatiques fraîchement dissociées. Cette inhibition est spécifique, car des cellules rétiniennes du même embryon peu-

vent s'agréger en présence de ce sérum anti-foie ; et les cellules hépatiques incubées avec le "sérum inhibiteur" peuvent, après lavage, retrouver leurs propriétés agrégatives normales.

De plus, et quoique ces observations dépassent le cadre que nous nous sommes fixés, il faut signaler que des facteurs immunologiques sont également impliqués dans l'agrégation des éponges (SPIEGLE 1954, (37), HUMPHREYS 1963 (38) .

E) Parmi les différents facteurs de l'agrégation que nous venons d'étudier, il en est un certain nombre sur lesquels il faut insister en raison de leur importance dans le mécanisme de la liaison intercellulaire.

1°) Ces facteurs sont :

- la nécessité des ions divalents, surtout le calcium
- l'importance d'une température optimale
- l'existence d'une protéine sérique (encore que l'importance de ce dernier facteur doive être réévaluée à la lumière des travaux récents que nous avons cités).

Il est donc probable que, outre la formation des ponts calciques, l'agrégation cellulaire dépend de la régénération de matériaux de la surface cellulaire enlevés ou modifiés par la dissociation. Cette hypothèse explique que l'agrégation est un processus thermo-sensible et requérant des fractions protéiques.

2°) A l'inverse, la nature du mécanisme des liaisons cellulaires peut être élucidée en étudiant les facteurs inhibant l'agrégation. Ainsi on a essayé :

- le métapériodate de sodium (10^{-4} M) qui semble réagir presque spécifiquement avec les carbohydrates. Ce corps inhibe la formation d'agré-

gats de cellules rétiniennes ou hépatiques et on peut en conclure qué des produits contenant des poly-saccharides sont probablement impliqués dans la liaison des cellules embryonnaires étudiées (MOSCONA 1962) (36).

- De même l'interférence de la D-glucosamine avec l'agrégation peut être due à un blocage plus ou moins direct des groupements de la surface cellulaire nécessaire au réattachement (GARBER 1963). (39).

- Enfin il est intéressant de signaler quel'inhibitionde la synthèse protéique (au niveau du RNA) par la puromycine, bloque de façon réversible l'agrégation et que l'actinomycine D (par arrêt de la formation de l'ARN-messager est donc indirectement de la synthèse protéique) bloque également l'agrégation cellulaire (MOSCONAMH AA. 1963) (40).

Une synthèse protéique semble donc nécessaire à l'agrégation des cellules embryonnaires dissociées.

L'agrégation des cellules embryonnaires par rotation a permis de définir trois points fondamentaux :

1°) Tous les autres facteurs étant égaux par ailleurs, les cellules ont d'autant plus tendance à s'agréger qu'elles sont mutuellement adhésives.

2°) Pour une population cellulaire donnée il est possible de faire varier d'une façon précise les différents facteurs qui peuvent affecter cette adhésivité.

3°) La synthèse d'un matériel protéique ou mucoprotéique est peut-être nécessaire à la formation des nouvelles liaisons cellulaires.

- CHAPITRE III -

DEVELOPPEMENT ET STRUCTURE DES AGREGATS EMBRYONNAIRES.

I. GENERALITES.

La possibilité qu'ont les agrégats de cellules embryonnaires de se développer et de construire des structures histio-typiques dépend :

- de leur composition cellulaire, qui doit être mixte, épithéliales et fibroblastique,
- de leur taille,
- des proportions relatives des divers types de cellules,
- et surtout du stade de différenciation des cellules au temps de leur dissociation ; ainsi (WEISS P. et JAMES 1955) (41) des cellules de la peau d'un embryon de poulet de 5 jours donneront naissance à l'intérieur des agrégats à des bourgeons de plume et à d'autres formations différenciées, alors que des cellules ectodermiques d'embryons plus jeunes formeront des structures neurales. De plus, des intéractions inductives sont possibles entre les différentes cellules de l'agrégat (TRINKAUS 1956) (42). Enfin , lorsqu'il n'existe pas de marqueur évident, l'identité précise du tissu formé peut être difficile à déterminer.

Parmi ces différents facteurs, il en est deux qui ont probablement une importance particulière. Ce sont :

- la taille de l'agrégat,

- et le stade du développement des cellules, car ce facteur conditionne leur adhésivité. En effet, dans une culture agitée, on voit plusieurs formations : cellules libres, grappes de cellules (clumps) lâchement unies, des voiles cellulaires centrés par des fibres végétales ou des débris , et évidemment un ou plusieurs agrégats.

L'agrégat se distingue généralement de ces diverses formations par sa taille (encore que les "clumps" ou les "voiles" puissent avoir un diamètre plus important), mais surtout par le fait qu'il s'agit d'une structure cohérente, difficilement dissociable, et qu'on peut assimiler à un fragment de tissu.

Sur une coupe histologique, il apparaît ovale ou sphérique, recouvert par une couche continue et régulière de cellules périphériques ; à l'intérieur, les cellules sont étroitement tassées et ne paraissent pas plus distantes que dans un tissu.

II. DEVELOPPEMENT DES AGREGATS.

A) Les combinaisons de cellules provenant de tissus homologues d'embryons d'espèces différentes mais au même stade de développement ont montré que "l'histo-chimérisme" était possible. Ces cellules sont compatibles , car il n'y a pas de signes de souffrance dus à la combinaison interspécifique. Il semble donc , du moins dans les limites de ces travaux, que les similitudes des fonctions cellulaires et des tissus d'origine sont plus importantes dans l'organisation tissulaire de ces chimères que les différences d'origine taxonomique. Dans la plupart des cas les cellules dissociées gardent leur capacité histioformatrice et les continuent dans les agrégats ; souvent même, elles conservent grossièrement la morphologie caractéristique

du tissu d'origine.

L'étude de ces agrégats isotypiques et chimériques formés de cellules embryonnaires normales autorise d'intéressantes perspectives de travail : recombinaison de cellules de donneurs normaux et mutants, tels que les a fait HADORN 1959 (43) sur des mutants de drosophile, permettant l'étude précise des spécifités de contact cellulaire et de leur rapport avec les processus génétiques.

B) Les combinaisons hétérotypiques (c'est-à-dire de cellules de tissus différents d'espèces identiques ou différentes) ont montré agalement une remarquable tolérance mutuelle. De plus, on a pu voir que les cellules se groupent par affinités d'origine tissulaire : par exemple, dans un agrégat composé de cellules embryonnaires hépatiques et cartilagineuses de poulet et de cellules cartilagineuses de souris, les cellules hépatiques se groupent en une masse unique distincte de la formation cartilagineuse composée de cellules de double origine. De plus, pour un mélange de cellules données, l'arrangement mutuel topographique est précis : les cellules épidermiques sont à la superficie et les cellules cartilagineuses au centre d'un agrégat mixte interspécifique.

C) La structure interne des agrégats est variable :

- dans un premier stade (qui dure environ 24 heures) les cellules sont réparties au hasard dans de nombreux amas à l'intérieur des agrégats "primaires").

- puis au cours des heures suivantes (de la 24° à la 36° heure) la mobilité cellulaire disparaît, et les agrégats "secondaires" sont faits de groupes cellulaires identifiables histiologiquement et composés de

cellules semblables.

- dans les agrégats"tertiaires" la croissance et la différenciation réapparaissent.

Si des agrégats sont greffés à ce stade à un animal histocompatible, ils se vascularisent et leur développement peut être organotypique (WEISS P. et TAYLOR 1960) (44).

Il est évident qu'il doit exister une différence entre les mécanismes de liaison cellulaire des agrégats "primaires" et "secondaires", les cellules passant d'une distribution au hasard à un groupement d'éléments fonctionnellement identiques. Mais on ne sait rien d'un tel mécanisme, d'autant plus surprenant que, une heure après le début de l'agrégation, les cellules sont unies entre elles en certains points de façon très intime (LESSEPS) (45).

Deux ordres de phénomènes représentent les aspects les plus frappants du comportement cellulaire dans les agrégats :

- le groupement de cellules identiques
- et la régionalisation de ces groupements,

ces deux phénomènes étant probablement liés.

- le groupement des cellules en régions séparées ressemble à de nombreux égards, aux mouvements morphogénétiques de l'embryon (DE HAAN 1958) (45). On l'explique en disant que les cellules homologues ont une iso-affinité plus grande que leur hétéro-affinité . La mobilité et l'adhésivité différentielle des cellules jouent un rôle dans ce phénomène comme dans

- La régionalisation qui se voit dans des agrégats composés de cellules de deux (ou plus) tissus différents et dépend de sa composition

cellulaire. Cette régionalisation peut ou non mimer les relations des tissus homologues dans l'organisme. Son mécanisme est tout aussi mystérieux ; il ne s'agit probablement pas de la réapparition de l'inhibition de contact (CURTIS) (34), mais peut-être de "l'orientation par le contact" des cellules adjacentes et de produits extracellulaires. (WEISS P. 1958, (47), MOSCONA 1960 (19)). Une autre hypothèse (STEINBERG 1963) (48) fait jouer un rôle majeur à des différences quantitatives de la force d'adhésion des cellules dont les mouvements se font par ailleurs au hasard.

Un agrégat une fois formé peut se cultiver. Nous avons vu qu'il était possible de le greffet à un autre compatible ou de l'entretenir en cultures organotypiques (WOLFF E.) (49). Dans ces conditions, il continue sa croissance car les mitoses reprennent ; il continue à se différencier, des influences inductives peuvent apparaître, il se réorganise.

L'agrégat cultivé a été étudié selon les techniques histologiques classiques. Les coupes colorées à l'hémalun-éosine ont montré une bordure de cellules aplaties pseudo-épithéliales, recouvrant des cellules arrondies et si étroitement serrées qu'elles donnent l'apparence d'un tissu. C'est de cette façon, bien entendu, que l'on a pu reconnaître l'organisation des cellules à l'intérieur des agrégats, avec ses multiples modalités. Mais un problème subsiste : ces groupes cellulaires qui ressemblent à s'y méprendre à un tissu en ont-ils réellement les propriétés ? Il est possible (MOSCONA 1962) (36) que les cellules fabriquent un matériel extracellulaire favorisant leur agrégation. Mais on ne sait rien sur l'existence, à l'intérieur des agrégats d'un "ciment intercellulaire" dont la présence serait nécessaire pour affirmer que l'on a à faire à un tissu. Il n'existe en particulier aucun travail histochimique recherchant la réticuline, élément fondamental de la structure tissulaire, ou encore le collagène ou les mucopolysaccharides.

- CHAPITRE IV -

L'AGREGATION DES CELLULES NEOPLASIQUES DE MAMMIFERES CULTIVEES "IN VITRO"

I. GENERALITES.

Nous avons vu au chapître I que les premières études sur l'agrégation des cellules néoplasiques de mammifères avaient été faites à partir de tumeurs spontanées ou expérimentales de la souris. Ces tumeurs, préalablement dissociées par la trypsine, étaient agrégées en cultures stationnaires. Le seul problème au cours de ces travaux était le groupement des cellules (parfois mélangées à des cellules embryonnaires) et leur histogénèse. Les rapports éventuels entre l'agrégation et la malignité n'étaient pas soulevés.

II . L'AGREGATION DES CELLULES DE MAMMIFERES EN LIGNEES CONTINUES n'a été que très récemment décrite. (MOSKOWITZ (9), LEIGHTON (8).

A) La technique est sensiblement la même que celle utilisée par MOSCONA pour les cellules embryonnaires : agrégation par rotation sur un agitateur giratoire. Les cellules utilisées étaient soit fibroblastiques, (Mox 3, L)ou épithéliales (WISH, GIRARDI'S HEART, HEP 2, SALK. MONKEY HEART) cultivées en couches monocellulaires stationnaires dans un milieu d'EAGLE enrichi en acides aminés et en vitamines , avec 10 % de sérum de cheval ou de

dialysat de sérum ou d'extrait de

Les cellules étaient détachées par un grattoir en caoutchouc et dispersées à la pipette, puis réparties dans les Erlenmeyer de 25 ml dans dans 3 ml d'un volume identique à des concentrations variables, à 37° c et à 70 tours /minute. On prenait soin de vérifier que les suspensions contenaient uniquement des cellules dispersées ou au maximum des groupes de 2 à 3 cellules.

B) Résultats : Deux sortes de formation apparaissent dans ces conditions :

- Les agrégats proprement dits sphériques ou ovoïdes à surface régulière très cohérents.

- Les "clumps" ou grappes en général plus petits, irréguliers, et lâches. Toutes les cellules testées donnaient,parfois dans des conditions différentes, des agrégats dans un délai de 1 à 4 jours.

On voit donc que cet auteur a repris la technique de MOSCONA et étudié certains paramètres.

- La taille de l'inoculum , avec un maximum de 1 X 10^6 cellules par fiole, les agrégats devenant plus petits au-delà de ce nombre.

- L'état des cultures et en particulier l'origine de sérum ajouté au milieu dans les sub-cultures précédant l'agrégation.

- La nature des facteurs enrichissant le milieu de culture de l'agrégation : sérums d'animaux différents et diversement traités, dialysats d'extraits tissulaires. Les résultats sont variables, il n'y a pas de conditions idéales pour tous les types cellulaires.

C) Un autre phénomène intéressant est celui de l'avenir de ces agrégats : d'une manière générale il avait été montré que les agrégats issus

de trois lignées cellulaires (HEP 2 WISH, L) pouvaient grossir et se fragmenter en agrégats-fils, à condition que le milieu soit renouvelé fréquemment : par exemple les agrégats de cellules épithéliales HEP2 prennent la forme d'un disque qui après plusieurs semaines de culture se hérisse de protubérances, atteint un diamètre de 5 mm pour un diamètre initial de 0,2 mm et se divise en une douzaine de fragments qui vont grossir et former, chacun d'entre eux, un agrégat de forme et de dimensions identiques à l'agrégat initial. Cet auteur a pu ainsi observer plusieurs générations successives. Cette fragmentation des agrégats peut aussi être volontaire, soit en le coupant en plusieurs morceaux, soit en le dissociant partiellement par pipetage. Dans ces cas également, les fragments se répareront et donneront un élément semblable à l'agrégat originel. Nous verrons dans le dernier chapître, les hypothèses que l'on peut tirer de ces faits.

D) Quant à la structure histologique de ces agrégats, elle avait été ébauchée dans ce travail. Les agrégats de cellules HEP 2 et WISH sont entourés d'une couche unique, qui paraît prendre une disposition épithéliale et qui est séparée du reste de l'agrégat par un espace vide (artéfact ?). Presque tous les cytoplasmes cellulaires et beaucoup de noyaux (surtout à la périphérie) sont colorées par l'hémalun-éosine. Mais aucune coloration spécifique ne semble avoir été faite, qui puisse mettre en évidence un "ciment intercellulaire" où toute substance susceptible d'expliquer l'adhésion des cellules : réticuline, collagène, mycopolysaccharides.

III - TRAVAUX PERSONNELS .

L'agrégation par rotation étant devenue classique pour les cellules embryonnaires et démontrée pour certaines lignées cellulaires de Mammi-

fères , le problème s'est posé de savoir si cette propriété était commune à toutes les souches et à toutes les lignées cellulaires ou si elle n'était que l'expression d'une fonction particulière. En effet, les différentes lignées étudiées par MOSKOWITZ ont une triple origine : soit un tissu normal, soit un tissu néoplasique, ou enfin une souche cellulaire normale et transformée in vitro (WISH). Il semblait donc que le caractère commun de toutes ces populations cellulaires était leur culture indéfinie in vitro et c'est ce dernier caractère, seul, qui pouvait s'exprimer dans l'agrégation. Cependant, selon les conceptions de HAYFLICK (50), on doit considérer toutes ces lignées cellulaires hétéroploïdes comme malignes, encore que leur transplantabilité n'ait pas été démontrée de façon formelle. Dans ce cas, on pouvait imaginer que la propriété de s'agréger était en rapport avec leur caractère néoplasique. C'est cette possibilité que nous avons essayé de démontrer.

A) Le choix des cellules était fondamental, il fallait pouvoir comparer deux populations cellulaires, dont l'une ne différerait de l'autre que par un seul caractère biologique : la malignité et il ne pouvait s'agir que de lignées cellulaires, c'est-à-dire de cellules cultivables indéfiniment.

Nous avons utilisé deux types de cellules :

1°) D'une part, des cellules d'embryon total de rat Wistar mises en culture en 1962, cultivées de façon ininterrompue jusqu'à ce jour, d'aspect fibroblastique et ne provoquant pas de tumeurs après inoculation au rat nouveau-né. Nous appelons ces cellules E.R.

La souche tumorale provient d'une sous-lignée de cette souche normale. Elle a été infectée par le virus du sarcome de Rous (BRYAN), puis

inoculée au rat nouveau-né chez lequel s'est formée une tumeur qui a été prélevée, trypsinisée et a donné naissance à une lignée de cellules tumorales qui ne contiennent plus le V.S.R. et dont l'aspect est mixte, épithélial et fibroblastique (ROTHSCHILD, 1. et FEBVRE H. 1963) (51) .

2°) D'autre part, nous avons pu utiliser des lignées cellulaires venant du National Cancer Institute développées par K. SANFORD dans le laboratoire de EARLE (52).

Ces lignées proviennent du tissu cellulaire sous-cutané d'une souris C3H normale. Après explantation, ce tissu a donné naissance à plusieurs lignées : l'une d'elles a été clonée et une nouvelle population cellulaire s'est développée à partir de cette unique cellule. Après plusieurs mois, et les cultures ayant été divisées en sous-lignées, certaines de celles-ci sont restées normales, tandis que d'autres (les plus nombreuses) se "transformaient spontanément" et devenaient capables d'induire des sarcomes chez des souris isologues. Dans ce même temps, une des lignées malignes ou clone NCTC 2 472 prenait in vitro une morphologie fibroblastique qu'elle a gardé jusqu'à présent, tandis que le clone normal NCTC 2 565 acquérait une morphologie pseudo-épithéliale qui persiste actuellement.

Nous avons utilisé personnellement deux clones :

- le clone N1 dérivé du clone NCTC 2 472 hautement malin donnant près de 100 % de tumeurs après inoculation à des souris C 3 H.

- Le clone N2 dérivé du clone NCTC 2 555 ne provoquant pas de tumeurs même après inoculation de plusieurs millions de cellules.

Ces deux clones sont parfaitement stables quant à leur morphologie et à leur pouvoir tumorigène ou non tumorigène.

De plus ils ont un caryotype différent et caractéristique.

Le clone N1 a un nombre modal de 55 chromosomes avec 0 à 2 métacentriques et souvent un télocentrique extra-long.

Le clone N2 a un nombre modal de 62 chromosomes avec 13 métacentriques.

D'autre part, BARSKI a obtenu un variant de N1 avec 80 chromosomes et SCALETTA et EPHRUSSI (53) un variant à 49 chromosomes.

- Le clone M6 de BARSKI (54) est une cellule qui résulte de l'hybridation des deux lignées précédentes. Il partage un certain nombre de propriétés de ses parents. Sa morphologie est mixte, fibroblastique et épithéliale. Surtout son nombre total de chromosomes est de 100 avec des marqueurs hérités de N1 (télocentriques) et de N2 (métacentriques).

Enfin ce clone est hautement tumoral son pouvoir tumorigène étant égal à celui de la lignée N1.

3°) Il est à remarquer que toutes les souches cellulaires utilisées sont des lignées , c'est-à-dire des cellules cultivables indéfiniment. Or, récemment, on a objecté que toutes les lignées cellulaires étaient composées de cellules hétéroploïdes transplantables dans la poche jugale du hamster et donc tumorales et que seules les souches cellulaires, développées à partir d'un tissu normal, diploïdes et non transplantables étaient normales et non malignes. Mais cette position nous paraît peu nuancée et avec FOLEY (55) nous y apporterons les observations suivantes : le seul critère indiscutable de la malignité d'une souche ou d'une lignée cellulaire est sa transplantabilité chez l'animal d'origine ou chez un animal de la même lignée isogénique, avec formation d'une tumeur histologiquement maligne et métastasante. En effet, aucun autre critère n'emporte la conviction , ni l'aspect

morphologique, car la transformation maligne ne s'accompagne pas obligatoirement d'une transformation morphologique, ni même l'analyse chromosomique sur laquelle on a beaucoup insisté ; très schématiquement, on a pu dire qu'une cellule diploïde était normale, alors qu'une cellule hétéroploïde était maligne, transplantable. Mais cette affirmation souffre de très nombreuses exceptions. En effet, on a décrit des cellules diploïdes ou quasi diploïdes de malignité certaine (MOORHEAD 1955), (56); YERGANIAN 1963, (57), a transformé des lignées cellulaires d'embryons de hamster par le polyome ou le SV 40, sans provoquer d'altérations chromosomiques ; enfin, de nombreuses tumeurs spontanées ou virales sont diploïdes (BERNAM 1958 (58), HAUSCHKA 1961, (59). Si la diploïdie n'est donc pas suffisante pour affirmer la bénignité, l'hétéroploïdie n'est pas non plus la signature certaine de la malignité. Ainsi FOLEY a étudié plusieurs lignées cellulaires, toutes hétéroploïdes, quant à leur transplantabilité dans la poche jugale de hamster.Or seules les lignées issues d'un tissu néoplasique étaient transplantables. HULL (1962) (60) a obtenu une lignée cellulaire à partir de reins de singe non infectés par le SV 40, avec hétéroploïdie, mais sans que des millions de cellules puissent être homo-transplantables.

Tout ce que l'on peut dire c'est que l'hétéroploïdie semble assez souvent associée à la malignité et la diploïdie à la non malignité. Mais l'analyse chromosomique n'est en aucun cas suffisante pour affirmer la bénignité ou la malignité. La transplantabilité paraît actuellement le meilleur critère, surtout la transplantabilité dans la poche jugale du hamster, lorsque l'homo ou l'isotransplantation n'est pas possible; l'hétérotransplantabilité étant plus difficile à juger en raison de la réaction de greffe.

Nos lignées cellulaires normales et malignes sont hétéroploïdes , mais se différencient très néttement par leur isotransplantabilité.

- Les cellules ER ne donnent jamais de tumeur après inoculation au rat nouveau-né.

- Alors que les CT4 cellules transformées par le VSR en provoquent dans 96 % des cas.

- Les cellules N1 de SANDFORD 1 % de tumeurs, à BARSKI, 0 % de tumeurs sur 35 souris inoculées.

C'est pourquoi nous considérons les cellules ER et N2 comme "normales" et les cellules CT4 et N1 comme néoplasiques.

- Les cellules du clone M6 de BARSKI étant aussi malignes que les cellules N1 avec 100 % de tumeurs.

B) Matériel et Méthodes :

Les méthodes utilisées pour la formation des agrégats sont essentiellement identiques à celles de MOSCONA, c'est-à-dire l'agrégation par rotation sur l'agitateur giratoire de NEWBRUNSWICK 676-210 produisant une force centripète prédominante à l'intérieur des Erlenmeyer (HAYES R.L. 1965) (61).

Les cellules sont cultivées en couches monocellulaires, soit sur verre dans des flacons de 125 ml, soit dans des boîtes de Pétri en plastique (FALCON R.).

Le milieu de culture est le milieu d'EAGLE enrichi en sérum de cheval ou de poulain. Nous avons utilisé différentes variantes qui nous ont donné des résultats sensiblement égaux.

1) Soit le milieu de EAGLE 1955 (B.M.E.) enrichi 4 fois en acides aminés et vitaminés, additionnés au taux de 10 % de tryptose phosphate.

2) Soit récemment le B.M.E. fabriqué par General Biochemics et présenté sous forme d'une poudre homogène à laquelle il suffit de rajouter du CO3 HNa après l'avoir dissous dans une quantité convenable d'eau bidistillée stérile. Ce dernier milieu n'est pas enrichi.

Dans les deux cas, on utilise du sérum de poulain ou de cheval décomplémenté à une concentration variant de 5 à 15 %.

Les milieux synthétiques et le sérum sont filtrés sur membranes millipore H A , de même que tous les produits qui entrent en contact avec les cellules.

Celles-ci sont subcultivées après trypsinisation douce (trypsine à 0, 25 %) dans un tampon classique type PBS de DULBECCO ou sans calcium ni magnésium (MOSCONA - 22). C'est après une trypsinisation identique que les cellules sont prélevées en vue de l'agrégation avec les modalités que nous verrons plus loin.

Une fois détachées de leur support, les cellules sont très soigneusement dispersées avec une pipette fine ; on ne tolère que des clumps de deux ou trois cellules au maximum. Elles sont comptées sur une cellule de THOMA. Leur viabilité est vérifiée par la coloration au bleu de trypan.

En général, on les répartit à raison de 1 X 10^6 par ERLENMEYER de 25 ml sous un faible volume ; on complète à 3 ml le milieu de culture en ajoutant du milieu 1 ou 2 plus 10 % de sérum dans les conditions standard ; enfin, on fait passer stérilement un mélange gazeux d'air + 5 % de

CO2 jusqu'à un pH de 7,4 environ et on ferme hermétiquement les ERLENMEYER avec des bouchons en caoutchouc neutre. On place les ERLENMEYER sur le plateau de l'agitateur ; on règle la température à 37°, la vitesse à 70 tours/minute.

C) Les résultats sont les suivants et portent environ sur 200 Erlenmeyer :

1°) Les cellules normales ER ou N2 ont un comportement identique : elles ne forment pas d'agrégats (fig. 1) ; les cultures agitées ont été prolongées plusieurs jours et dans certains protocoles plusieurs semaines ; les cellules restent à l'état libre ou forment parfois des groupes de quelques centaines centaines ou milliers d'éléments : mais fait essentiel, ces groupes cellulaires (les "clumps" des anglo-saxons) sont instables et très peu cohérents. Ils forment le plus souvent une sorte de voile d'épaisseur infime aux contours irréguliers, parfois replié sur lui-même. Dans d'autres cas, il apparaît de très petits amas cellulaires, d'un diamètre voisin de 0,1 mm, très irréguliers et toujours très facilement dissociables. Cependant, il faut noter qu'exceptionnellement il peut apparaître dans les cultures agitées de cellules N2 un ou des agrégats de petite taille, mais cohérents. Nous verrons l'interprétation que l'on peut en donner dans notre discussion.

2°) Les cellules malignes donnent un résultat très différent (62 - 63), car les cellules s'agrégent rapidement pour former une structure cohérente, l'agrégat. Il existe des différences dans la modalité d'agrégation des différentes lignées indiquées utilisées ; mais dans l'ensemble, la cinétique du phénomène est identique (fig. 2 et 3).

Très rapidement, l'opacité du milieu diminue, car le nombre

des particules en suspension diminue. En effet, l'agrégation est très rapide et après quelques heures on voit à l'oeil nu des micro-agrégats très nombreux dans un milieu de culture clair, car il n'y a pratiquement plus de cellules libres. Cette agrégation initiale avec disparition presque totale des cellules isolées est un phénomène fondamental et constant. Il s'observe rapidement , parfois en une heure, ou bien en 5 à 6 heures. En tout cas après 12 heures d'agitation, il y a des différences frappantes entre les cultures de cellules normales, uniformément opaques, car formées de cellules libres, et les cultures de cellules malignes , claires, car essentiellement formées de petits agrégats. Cette première étape de l'agrégation est commune aux trois cellules malignes, à quelques différences près.

La différenciation entre les modalités d'agrégation des trois lignées malignes commence donc entre 6 et 24 heures après le début de l'agragation par rotation.

Les cellules CT4 et le clone M6 ont un comportement très voisin. Le nombre des agrégats diminue probablement par fusion des agrégats primaires et leur volume augmente par un phénomène de croissance. Surtout tous les agrégats ont une forme et un volume sensiblement égaux, grossièrement sphériques,lisses,réguliers,avec un diamètre de 0,25 mm. De plus, le nombre des agrégats est grossièrement constant pour une population cellulaire initiale identique. Il existe "une figure d'agrégation" caractéristique de ces lignées cellulaires.

Les cellules de clone N1 ont une agrégation secondaire très différente et caractérisée par l'hétérogénéité et la variabilité. Dans chaque Erlenmeyer, on voit des types très divers d'agrégats ; dans les cas favorables

ils sont maximum en deux à trois jours, mais parfois plus tard vers le septième jour. A ce moment, leur taille est très variable : micro-agrégats à peine visibles (mais pas de cellules libres), nombreux agrégats de petite taille , inférieurs à celle des agrégats de CT4, ou M6, gros agrégats de diamètre nettement supérieur; enfin dans chaque culture il existe un, deux ou trois agrégats nettement plus volumineux, allant de 1 à 3 mm dans les cas habituels et exceptionnellement au-delà (1 cm). La forme de ces différents agrégats est également variable ; sphérique, ovoïde,ellyptique et souvent les plus gros ont une extrêmité effilée qui les prolonge.

3°) Dans les cultures de cellules normales et malignes on note parfois des formations qu'il peut être difficile de différencier d'un agrégat.

1 - D'une part , un certain nombre de cellules se fixent soit au fond soit au pourtour de l'Erlenmeyer, à la limite supérieure du milieu de culture . Ces cellules peuvent se détacher secondairement en nappes et être agitées dans le milieu de culture.

2 - D'autre part, il peut exister dans le milieu des particules (fibres végétales, poussières d'origines diverses) qui servent de points d'appel aux cellules qui s'attachent très facilement à elles et peuvent donner naissance à des voiles souvent très longs (10 mm) mais qui en aucun cas ne peuvent être assimilés à un agrégat, car il ne s'agit que d'une couche mono et pauci-cellulaire sans cohérence.

3 - Il peut exister un certain pourcentage de cellules qui ont agrégé spontanément avant que la culture n'ait été agitée. On pourrait dire qu'il s'agit là aussi d'agrégats, mais en fait on a affaire à un agrégat formé dans des conditions tout à fait différentes des autres, dont on ne doit pas te-

nir compte et qu'il faut par conséquent éliminer.

C) Les facteurs de l'agrégation des cellules néoplasiques.

L'agrégation des cellules malignes étudiées est un phénomène constant mais variable, comme tout phénomène biologique, c'est-à-dire que pour des conditions d'expérience rigoureusement identiques, le délai d'apparition le volume et la forme des agrégats est variable. En dehors de ces facteurs incontrôlables, il en est d'autres qu'il est possible de reconnaître et de mesurer. Nous allons les étudier successivement :

1) L'état de la culture cellulaire est sûrement un point très important. Les subcultures précédentes doivent être parfaites. Quant à la culture qui va servir à l'agrégation, elle doit être en phase de croissance exponentielle et ce, quelle que soit la souche cellulaire.

Il ne faut prendre ni des cellules trop jeunes, ni des cellules trop âgées en phase stationnaire. L'agrégation est possible, mais elle est souvent difficile ou moins importante.

2) Les méthodes de décollement et de dispersion de cellules. De Façon habituelle les cellules sont détachées par trypsination douce (trypsine à 0, 25 %, dans du PBS ou de l'EAGLE), puis dissociées dans la solution de trypsine et centrifugées. Après s'être débarrassé du surnageant, on suspend dans du milieu neuf. Nous avons éomparé cette technique.

a - A une trypsinisation sans centrifugation : on laisse agir la solution de trypsine pendant 15 à 30 secondes, puis on la retire sauf un millilitre. On met à l'étuve à 37° pendant 10 minutes et on suspend dans du milieu neuf.

b - Au décollement par grattage au caoutchouc.

c - A la versénisation après lavage avec un tampon sans Ca ni Mg, on fait agir après une solution de Versène à 0,25 % et on continue les opérations comme pour une trypsinisation .

La technique qui nous a donné les meilleurs résultats est la trypsinisation sans centrifugation. Cet avantage ne semble pas dû à une meilleure viabilité car le pourcentage de cellules non viables colorées par le bleu de trypan est sensiblement le même dans toutes les techniques. Il est probable qu'il s'agit d'une altération cellulaire plus fine, due à la centrifugation. En tout cas la trypsine ne semble pas altérer les cellules plus que les autres techniques de décollement.

3°) Le nombre de cellules ensemencées dans chaque Erlenmeyer est également important. Il est évidemment fonction de la taille des cellules. Cependant la plupart des cellules en lignées continues, dont les cellules que nous utilisons, ont un diamètre sensiblement voisin, que l'on peut fixer très approximativement à 10 µ. Dans ces conditions , le nombre de cellules par Erlenmeyer doit être de 1×10^6. Il est possible d'utiliser un nombre moins important de cellules et nous avons obtenu des agrégats avec 2×10^5 cellules par Erlenmeyer. Mais il est évident que les possibilités de rencontre des cellules sont très diminuées. 5×10^5 cellules par Erlenmeyer est un chiffre qui peut donner de bons résultats.

Au-delà de 1×10^6 cellules par Erlenmeyer, l'agrégation n'augmente pas proportionnellement au chiffre cellulaire. Ainsi avec 2×10^6 cellules par Erlenmeyer, les résultats sont moins bons qu'avec 1×10^6 cellules. Celà est dû probablement à la diminution du mouvement relatif des cellules et donc de leur possibilité de reconnaissance éventuelle. En effet, les différentes

cellules d'une population ont une adhésivité mutuelle variable et il est donc nécessaire que les cellules puissent se rencontrer et se "choisir".

4°) Le milieu de culture des cellules en agrégation . Nous avons vu que nous utilisons :

- un milieu synthétique (EAGLE 55 ou 59) additionné ou non de tryptose-phosphate.

- un sérum animal et en règle du sérum de cheval ou de poulain au taux de 10 %.

Il n'existe pas de différence sensible, selon le milieu synthétique et l'addition de tryptose.

a) - Mais la nature et la qualité du sérum font varier notablement l'agrégation : ainsi les souches que nous avons utilisées sont habituellement cultivées avec le sérum de cheval. Si ce sérum est remplacé dans les mêmes proportions par du sérum de veau foetal les cellules N1 ne s'agrègent presque plus. Il n'est plus possible de les distinguer des cellules N2 au même stade de culture agitée. Nous n'avons pu en déterminer les raisons : présence d'un facteur toxique, ou absence d'un facteur de croissance présent dans le sérum adulte et nécessaire à la souche N1.

La concentration de sérum a également un rôle déterminant : la concentration optimale semble être de 10 à 15 % du milieu final et on n'observe guère de variations jusqu'à 3 ou 5 %. Une trace de sérum suffit bien souvent à la formation des agrégats.

Par contre, l'absence totale de sérum animal a un effet marqué sur l'agrégation , qui semble très diminuée ou supprimée. En fait la situation nous paraît plus nuancée et nous insisterons sur les points suivants :

- Un milieu dénué totalement de sérum est plus alcalin (car le sérum diminue en règle le pH des milieux de culture). Il est donc nécessaire , soit de gazer plus fortement le milieu, soit d'utiliser un milieu très tamponné et dont le pH initial est déjà à 7,4.

- De plus, il est évident que manquent des facteurs que ne contient pas le milieu synthétique. Outre des facteurs de croissance, le sérum contient peut-être des éléments nécessaires à la réparation des cellules traumatisées par la trypsinisation. Il est possible que les cellules aient besoin de sérum pour synthétiser à nouveau les éléments de leur surface, ou une substance diffusible extra-cellulaire.

Cependant si l'on augmente par Erlenmeyer le nombre des cellules cultivées sans sérum (à X 10^6 cellules par exemple) il est possible de voir un certain nombre d'agrégats toujours inférieur à celui que l'on obtiendrait avec un milieu complet. Il est donc probable qu'il existe dans la population un certain nombre de cellules capables de s'agréger en l'absence de sérum, mais que ce nombre est faible, d'où la nécessité d'augmenter le nombre total des cellules. Enfin l'agrégat étant formé , il ne possède pas la gamme des facteurs de croissance présents dans un milieu complet, ce qui explique qu'il ne peut grossir.

La possibilité d'obtenir des agrégats dans un milieu sans sérum est importante, d'une part pour expliquer le mécanisme de l'agrégation, d'autre part en fonction des observations de A.S.G. CURTIS (21), qui semble avoir récemment isolé un facteur sérique qui inhiberait l'agrégation , mais serait détruit à 38°.

b) - Deux autres facteurs du milieu sont à discuter :

- le pH: Nous avons noté son importance à propos de l'agrégation sans sérum animal. Il est nécessaire d'amener la culture à un pH compris entre 7,2 et 7,4 avant de commencer l'agitation. A un pH plus important il y a souffrance cellulaire et l'agrégation est perturbée. Cependant, elle reste possible. 24 ou 48 heures après le début de l'agrégation, l'influence du pH semble inverse : il est fréquent, mais non constant de noter que le volume des agrégats est plus important dans les Erlenmeyer à pH alcalin. Ce phénomène est difficile à interpréter. Il est possible (mais inexpliqué), que le mécanisme qui réunit les agrégats déjà formés soit plus actif à pH 7,6 - 7,8, qu'à pH 7 - 7,2.

Cependant, cette augmentation spontanée du pH au cours de l'agragation, dans certains cas, n'est probablement pas univoque. Il est probable qu'on peut mettre en cause, parfois la non étanchéité de la fiole , parfois une souffrance cellulaire avec ralentissement ou arrêt du métabolisme, d'où l'alcalinisation, d'où l'altération de certaines cellules, et l'on a constaté que des cellules en souffrance pouvaient agréger.(parfois mieux que des cellules tumorales). Enfin une cause intrinsèque qui nous échappe. Il faut noter que la plupart des gros agrégats à pH alcalin sont assez instables et dissociables.

Cependant , il nous est arrivé de rencontrer, au cours de ce travail , des agrégats d'un diamètre important (3 mm) extrêmement stables et calibrés , apparus dans un tel milieu alcalin. Ainsi la formation de gros agrégats peut s'accompagner d'un pH alcalin , sans qu'il soit possible d'en déterminer le mécanisme, ni même de savoir s'il s'agit là d'une cause ou d'un effet.

(parfois mieux que des cellules tumorales). Enfin une cause intrinsèque qui nous échappe. Il faut noter quela plupart des gros agrégats à pH alcalin sont assez instables et dissociables.

Cependant, il nous est arrivé de rencontrer, au cours de ce travail, des agrégats d'un diamètre important (3 mm), extrêmement stables et calibrés, apparus dans un tel milieu alcalin. Ainsi la formation de gros agrégats peut s'accompagner d'un pH alcalin, sans qu'il soit possible d'en déterminer la mécanisme, ni même de savoir s'il s'agit là d'une cause ou d'un effet.

- La concentration ionique et plus particulièrement les ions Ca et Mg sont d'autres facteurs importants. Ces ions sont indispensables à l'agrégation des cellules embryonnaires fraîchement dissociées (MOSCONA, 1965,24). D'autre part, MOSKOWITZ (1964 - 64) semble avoir utilisé uniquement un milieu contenant des concentrations normales de ces ions dans son étude sur l'agrégation des lignées cellulaires. Or, nous avons noté à de nombreuses reprises, et de façon nette, que l'agrégation était possible en l'absence de ces deux ions. Pour cette étude, nous avons utilisé le milieu d'EAGLE pour culture en suspension (65) ne contenant pas de calcium et après avoir dissocié les cellules dans ce milieu. Cependant nous avons ajouté 10 % de sérum de cheval non dyalisé, qui contient évidemment des traces de calcium qu'il n'est pas possible de chiffrer. Cependant, on peut estimer qu'un tel milieu contient de 10 à 100 fois moins de calcium que le milieu standard. Or l'agrégation apparaît dans un délai normal (le calcium ne semble donc pas indispensable aux premiers stades de l'adhésion) et la figure finale de l'agrégation ne diffère pas d'une manière sensible de celle obtenue dans les conditions standard. Ce point nous semble très important et ne confirme pas la plupart des données de la littérature.

5°) - Les facteurs extérieurs.

a) La vitesse de rotation du plateau de l'agitateur a la même action sur l'agrégation des cellules en lignée continue que sur les cellules embryonnaires.

Entre 65 et 75 tours/minute l'agrégation cellulaire est maximale.

Au-delà de 75 tours/minute, la taille des agrégats diminue avec l'augmentation de la vitesse de rotation : à 90 tours/minute, il n'y a plus que de très petits agrégats ; à 100 tours, l'agrégation est totalement inhibée.

b) L'agrégation cellulaire est un phénomène très sensible à la température : elle est optimale entre 37 et 38° et elle diminue très nettement quand la température baisse. Si à 30° de minuscules agrégats peuvent encore se former, à 25° l'agrégation est totalement inhibée. Il ne faut pas se laisser abuser par l'existence de formations que l'on pourrait confondre avec des agrégats : en effet, il se forme des "voiles cellulaires" probablement dus à l'emprisonnement des cellules par la substance mucoïde qu'elles secrètent après la trypsination et qui semble persister.

Il est important de noter que l'agrégation des cellules N1 n'apparaît pas à 25°, même en l'absence de sérum animal. Cette constatation va à l'encontre de l'opinion de CURTIS (21) selon qui les sérums d'animaux contiennent une protéine inhibitrice de l'agrégation et qui ne serait détruite qu'à 38°. Si celà était vrai, les cellules N1 devraient s'agréger en l'absence de sérum à 25°

D'autre part, la thermosensibilité de l'agrégation cellulai-

re plaide en faveur de l'existence de phénomènes métaboliques pour expliquer son mécanisme.

6°) La culture des agrégats sur une surface de verre ou de plastique.

Après leur fixation au substrat, les cellules migrent au dehors de l'agrégat comme elles le feraient d'un explant tissulaire ; l'agrégat conserve très longtemps sa structure cohérente tridimensionnelle.

Au contraire, lorsqu'on explante, dans les mêmes conditions des "clumps" de cellules N2, celles-ci s'étalent rapidement sur le substrat formant en peu de temps une couche monocellulaire.

Ces faits nous permettent déjà de dire que le comportement des agrégats est proche de celui des tissus, ce que confirment les études histologiques et ultrastructurales.

D) Histologie et ultrastructure.

1°) L'étude histologique a été faite après fixation des agrégats dans le formol neutre, sur des coupes à 5 Mu, collées à l'albumine glycérinée. Après coloration à l'hémalun-éosine, les agrégats ont une forme arrondie ou ovale ; ils sont recouverts d'une couche cellulaire continue, parfois aplatie prenant un aspect pseudo-épithélial ; dans cette couche superficielle, il y a 3 ou 4 assises de cellules également aplaties, parfois syncytiales. En profondeur, les cellules sont arrondies ; la nécrose centrale est fréquente. Les noyaux et les cytoplasmes se colorent normalement. Il existe souvent des anomalies nucléaires liées à la malignité ou à la souffrance des cellules. Les limites cellulaires sont nettes.

Les cellules sont étroitement tassées de sorte qu'un observateur non averti ne peut pas reconnaître qu'il s'agit de cellules agglomérées et non pas d'un tissu (fig. 4 à 7).

Nous avons essayé de déterminer la nature de la substance intercellulaire avec des colorations spéciales :

- la coloration de VAN GIESON a été constamment négative : il n'existe donc pas de collagène intercellulaire.

- la coloration par le P.A.S. a montré :

. que les plages de nécrose étaient P.A.S. +

. Qu'il existait de rares éléments linéaires intercellulaires P.A.S. + au centre et à la périphérie, mais jamais dans les couches cellulaires superficielles.

- La coloration de GORDON SWEETS a mis en évidence une substance intercellulaire qui n'est très probablement pas la réticuline (au sens que les histologistes donnent à ce terme), car elle n'est pas colorée par le P.A.S. Ce matériel se présente sous forme de brins, de filaments courts irréguliers, mais toujours intercellulaires. Cette substance n'existe jamais dans les couches les plus superficielles. Sa nature est inconnue.

Ainsi l'histologie montre que :

- les agrégats ont une structure cohérente, organisée : on ne peut dire cependant que cette structure est histiotypique, car les agrégats ne sont composés que d'un type cellulaire et , de plus , les conditions de culture sont telles que les cellules ne peuvent avoir la forme et l'aspect qu'elles présentent à l'intérieur d'un tissu.

- il existe une substance intercellulaire expliquant la cohé-

sion des agrégats. Une très faible partie de ce matériel est probablement composée de mucopolysaccharides ; une autre partie est colorée par le GORDON SWEETS, mais n'est pas de la réticuline ; enfin de nombreuses zones intercellulaires ne prennent aucune des colorations utilisées : il existe donc, en plus des mucopolysaccharides, une ou plusieurs substances intercellulaires de nature inconnue.

2°) L'étude ultrastructurale au microscope électronique a été faite sur des agrégats N1 et des cellules N2 préfixés au glutaraldéhyde à 5 %, post-osmifiés, inclus dans l'araldite (BARNES, 66), coupés au microtome PORTER colorés à l'acétáte d'uranyle (WATSON, 67) et examinés à l'ELMISKOP L de SIEMENS:

- les cellules N2 (à l'intérieur des "clumps") ont une activité de membrane très importante et leur surface présente de nombreuses évaginations et microvillosités ; les distances intercellulaires sont considérables (de 1 000 à 5 000 Å) (fig.8).

- L'aspect ultrastructural des agrégats N1 est très différent : (fig. 9, 10, 11).

. La morphologie d'ensemble des cellules, même à l'intérieur d'agrégats de 6 jours, est conservée : noyaux et nucléoles, mitochondries et organismes intracytoplasmiques sont présents et morphologiquement intacts.

. mais ce sont la membrane cellulaire périphérique et l'espace intercellulaire qui montrent les aspects les plus intéressants (voir note bas page 45).

dans les agrégats jeunes (jusqu'à 48 heures) les cellules n'établissent le contact que par une partie de leur surface, peut-être plus souvent par le sommet des microvillosités. Mais très vite, le contact des cellules devient très intime ; en effet, dès la 48ème heure, on voit des zones où

les membranes sont aplaties, presque rectilignes et très étroitement accolées. On reconnaît la structure de chaque membrane avec sa couche claire, interne, entre les deux couches sombres dont l'épaisseur d'ensemble est d'environ 200 Å.

. La distance intercellulaire est à ce niveau comprise entre 150 Å et 250 Å ; mais surtout il existe à la surface des cellules un matériel dense se faisant vis-à-vis. Il s'agit là de desmosomes, formation que l'on voit au niveau des jonctions cellulaires de certains tissus et qui paraissent contribuer à la solidité de l'union intercellulaire. Ces desmosomes se voient uniquement dans les régions où le contact entre les cellules est le plus étroit ; il semble parfois réparti avec une certaine régularité.

- d'autre part, il faut signaler que cette étude ultra-structurale a montré dans les cellules et les agrégats N1 des particules d'aspect viral du type C ; ces particules semblent naître du bourgeonnement de la membrane cytoplasmique et parfois à l'intérieur des vacuoles. Elles sont le plus souvent extracellulaires. Nous en discuterons plus loin la signification.

Ainsi les études en microscopie optique et électronique permettent de comprendre pourquoi les agrégats forment une structure aussi cohérente qu'un tissu. Les cellules sont très étroitement tassées et séparées par une distance égale ou inférieure à celle qui sépare les cellules d'un tissu. En certains endroits les cellules paraissent même fusionnées, ce qui peut n'être qu'un artéfact.

Cependant ces études n'ont pas permis de déterminer la nature du "ciment intercellulaire".

NOTE : Les résultats d'une étude très récente au microscope électronique nous ont montré que les membranes s'accolaient très étroitement et que les desmozomes apparaissaient dans des agrégats de 105 minutes. Ces phénomènes sont donc extrêmement précoces.

- CHAPITRE V -

MECANISMES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AGREGATION.

I. LA MEMBRANE CELLULAIRE (DANIELLI, 68, WILLMER, 32) est formée d'une double couche de lipides, dans lesquels les régions polaires sont tournées vers la phase aqueuse, tandis que les régions hydrocarbonées sont perpendiculaires à la surface. Les chaînes protéiques sont situées parallèlement à la surface de la membrane et peuvent être liées aux lipides par des forces de VAN DER WAALS. En fait, on ne connaît pas la limite externe de la cellule et on a vu qu'en culture les cellules secrétaient des matérieux multiples de composition mal définie et qui ne sont peut-être que le prolongement de leur surface.

Les cellules développent des forces d'attraction et de répulsion par l'intermédiaire de leurs membranes :

- les forces de répulsion proviennent de la répulsion électrostatique entre surfaces chargées identiquement : elles opèrent sur des distances considérables.

- les forces d'attraction sont plus complexes :

  - force de VAN DER WAALS
  - attraction électrostatique entre groupes acides et basiques.
  - liaison s hydrogènes.

- liaison entre groupes chargés négativement par l'intermédiaire d'ions bivalents.

D'autre part, il existe des affinités sélectives entre certains types cellulaires (MOSCONA, 24) et on a invoqué (P. WEISS, 69, TYLER,70) des réactions de type antigène-anticorps pour les expliquer , encore qu'il s'agisse plus de la reconnaissance d'une identité que d'une complémentarité.

Il faut souligner que ces forces naissent au niveau de la membrane cellulaire et également au niveau d'expansionsou de sécrétions de cette surface, et que bien entendu, elles peuvent s'associer, les liaisons électrostatiques et les ponts calciques pouvant par exemple précéder la formation d'un ciment intercellulaire. Nous n'avons pas encore étudié le premier stade de l'agrégation et la nature des liaisons cellulaires dans les premières heures. Le travail sur la nature des adhésions cellulaires porte sur des agrégats âgés de 24 heures et peut donner une idée de ce que sont les liaisons cellulaires à un moment où l'agrégat est très cohérent. Nous avons utilisé trois techniques pour savoir s'il existait éventuellement une substance néoformée et diffusible qui participait à l'adhésion des cellules.

1°) La première technique a consisté à dissocier des agrégats. Nous avons pensé que cette technique pouvait indirectement apporter des précisions sur les liaisons intercellulaires.

a) La dissociation mécanique des agrégats par pipetage, agitation et dans certains cas par les ultra-sons est extrêmement difficile. La résistance à la dissociation est à peu près égale à cette d'un fragment de tissu de volume et d'origine semblables.

b) La dissociation chimique a été faite avec différents enzy-

mis en solution dans le PBS à pH (7, 2) à 37°.

Le tampon seul n'a pratiquement aucune action de désagrégation. Après 24 heures, seules de très rares cellules sont détachées.

Les enzymes : avant de soumettre les agrégats à leur action, nous les avons soigneusement lavés avec du PBS, afin d'éliminer le plus possible de sérum, puis nous avons distribué un nombre égal d'agrégats de volume sensiblement identique, dans plusieurs tubes. Toutes les solutions enzymatiques contenaient deux milligrammes de produit actif, sous volume de 0, 1 ml et diluées dans 0,9 ml de PBS. Les tubes sont portés au bain-marie à 37°.

Les résultats ont été les suivants :

- Trypsine Difco. La désagrégation est presque nulle après deux heures d'incubation et nette seulement après 24 heures ; mais si on double la concentration de la trypsine la désagrégation apparaît en deux heures, mais n'affecte que la partie superficielle de l'agrégat.

- Trypsine cristallisée. Ses résultats sont très différents : à concentrations égales cette trypsine a une action très rapide, quasi immédiate et massive ; en quelques minutes les agrégats sont presque totalement désintégrés, mais il persiste cependant un noyau central qui ne se désagrège que beaucoup plus lentement.

- La chymo-trypsine a une action qui semble intermédiaire entre celle des deux trypsines ; la lyse de l'agrégat apparaît après dix minutes et n'affecte que la partie superficielle.

- La papaïne a une action identique à celle de la trypsine cristallisée à la fois dans son intensité et sa rapidité.

- La pronase a également une action comparable à celle des enzy-

mes les plus actifs.

Par contre, la collagénase et l'élastase n'ont aucune action appréciable de désagrégation.

La différence dans l'action des deux lots de trypsine nous paraît liée au fait que la trypsine Difco (non cristallisée) contient probablement les inhibiteurs enzymatiques que l'on sait être présents dans le pancréas d'où cette trypsine est extraite.

2°) La deuxième technique a consisté à essayer d'isoler une substance diffusible qui serait fabriquée par les cellules et servirait à la formation d'un ciment intercellulaire des agrégats.

MOSCONA (1962 - 1963) (36-71) semble avoir réussi à deux reprises à mettre en évidence une telle substance à partir de cellules de vertébrés et d'éponges. Ces observations viennent d'être récemment confirmées(72). Les protocoles que nous avons faits dans ce but peuvent se schématiser ainsi :

1°) Après trypsination les cellules N1 ou CT4 en phase exponentielle ont été placées dans un Erlenmeyer avec un milieu variable (liquide de Tyroïde ou milieu de Eagle) mais toujours sans sérum et en ajustant le pH à 7,4. Puis les cellules ont été soumises à une agitation mécanique ou magnétique pendant un temps variable à 38°. Ensuite les cellules ont été centrifugées pour retirer le surnageant, qui a été centrifugé une deuxième fois à grande vitesse (environ 10 000 g) enfin ce surnageant bi-centrifugé (et ne contenant aucune cellule) a servi de milieu de culture à des cellules N1 et N2 cultivées parallèlement dans un milieu normal. Nous avons obtenu parfois la formation de voiles cellulaires (mais pas d'agrégats au sens où nous l'avons défini) avec les cellules N1 et N2 cultivées avec le surnageant de cellules N1 et suscep-

tibles de contenir cet hypothétique facteur diffusible.

2°) Dans une autre série d'expériences nous avons utilisé le protocole suivant :

a) Nous avons d'abord cultivé des cellules N1 ou CT4 en suspension , en utilisant soit une agitation magnétique dans des flacons pour cultures en suspension de Bellco, soit une agitation mécanique dans des Erlenmeyer. Le milieu de culture est composé :

- d'un milieu synthétique spécial sans calcium ni magnésium (EAGLE, 63) et fortement tamponné par des phosphatases.
- de sérum en proportion variable (15 % pour initier la culture en diminuant jusqu'à 5 %).
- enfin de méthyl-cellulose ou de carboxyméthyl cellulose au taux de 3 o/oo qui semble avoir à la fois un rôle nutritif et protecteur sur les cellules.

La température est réglée à 38° par l'intermédiaire d'un bain-marie. Dans ces conditions , et après une phase de latence de 1 à 2 jours, le nombre des cellules double environ toutes les 24 heures. Le pH et la densité cellulaire sont ajustés en ajoutant du milieu neuf complet.

C'est dans le milieu de telles cultures que nous avons cherché à mettre en évidence un matériel diffusible qui provoquerait l'agrégation cellulaire. On recueille une certaine quantité de suspension contenant les cellules en bon état. On centrifuge deux fois comme précédemment pour recueillir un surnageant débarrassé de cellules et de débris cellulaires.

Un tel surnageant utilisé comme milieu de culture pour l'agrégation de cellules N1 ou CT4 selon les cas semble promouvoir parfois cet-

te agrégation.

Mais ces faits demandent évidemment confirmation.

D'autre part, il n'est pas certain que le surnageant contient uniquement des substances qui auraient diffusé dans les milieux de culture, il conviendrait par exemple de démontrer par digestion enzymatique préalable, qu'il n'existe pas de quantité appréciable de DNA ou RNA cellulaire (73).

3°) Enfin dans une troisième série d'expériences à la recherche d'un matériel péri ou extra-cellulaire, nous avons utilisé les cellules cultivées en suspension, pour étudier leur agrégation. Nous avons ainsi remarqué que les cellules CT4, cultivées en suspension agrégeaient dans un délai nettement plus court que des CT4 fraîchement trypsinisés, les deux sortes de cellules étant cultivées, par ailleurs, dans des conditions strictement identiques.

Ces résultats ont été moins nets avec les cellules N1 mais grossièrement identiques.

Il semble donc que l'intégrité de la périphérie cellulaire est un facteur favorisant de l'agrégation.

- CHAPITRE VI -

FAITS ET HYPOTHESES SUR LE PHENOMENE D'AGREGATION CELLULAIRE. RELATIONS AVEC LE POTENTIEL DE MALIGNITE.

I. GENERALITES.

Le problème central qui émerge des faits rapportés ici concerne la qualité biologique des cellules, à laquelle est liée la propriété d'agrégation en culture. Cette propriété est,en particulier, l'attribut de deux variétés de cellules : cellules embryonnaires d'âge défini, cellules douées de propriétés malignes.

Il est tentant d'établir une certaine parenté entre ces deux types de cellules,sur la base de quelques analogies biologiques. Mais à la réflexion, il ne pourrait s'agir là que d'une hypothèse difficile à vérifier.

Il n'en résulte pas moins de nos observations rapportées ici qu'à cet égard il existe une différence fondamentale entre les cellules à potentialité maligne et les cellules de la même origine, mais qui ne partagent pas ces propriétés. Cette différence essentielle a été retrouvée aussi bien dans le cas de cellules rendues malignes par culture en présence du virus de Rous, que dans le cas de la souche de Sanford, où la transformation maligne du clone N1 est survenue spontanément durant les sub-cultures.

II. FACTEURS MICROBIENS ET VIRAUX.

La démonstration que des cellules malignes ont des propriétés agrégatives que ne partagent pas les cellules identiques, mais normales, soulèvent un certain nombre de questions.

Si la réalité même de ces agrégats ne peut être discutée, on pourrait objecter que l'agrégation n'est pas due aux cellules elles-mêmes, mais à un facteur associé aux cultures de cellules malignes et qui serait absent dans les cellules normales. Ces facteurs pourraient être : des bactéries, des mycoplasmes, des virus.

- Les bactéries : l'infection bactérienne est un problème majeur de la culture des tissus. S'il est relativement facile d'éliminer une contamination grossière, il est à peu près impossible de s'assurer que des cellules ne transportent pas des bactéries à l'état latent. Dans la mesure du possible, la stérilité des souches utilisées a été vérifiée et nous pensons qu'elles peuvent être considérées comme abactériennes. Les antibiotiques utilisés pour l'entretien des milieux ne modifient pas l'agrégabilité des cellules car des lignées cultivées parallèlement sans antibiotiques donnent les mêmes résultats.

- Les mycoplasmes sont un contaminant très répandu de la plupart des lignées cellulaires dans le monde. Ils pourraient modifier les propriétés agrégatives des cellules, soit en se fixant à leur périphérie, soit en modifiant leur métabolisme. Nous avons essayé de détecter d'éventuels mycoplasmes par l'ensemencement du surnageant et des cultures sur des géloses préparées selon la technique de CHANOCK (74).dans des boîtes de pétri hermétiquement fermées et à 37°. Ces recherches effectuées à plusieurs reprises

II. FACTEURS MICROBIENS ET VIRAUX.

La démonstration que des cellules malignes ont des propriétés agrégatives que ne partagent pas les cellules identiques, mais normales, soulèvent un certain nombre de questions.

Si la réalité même de ces agrégats ne peut être discutée, on pourrait objecter que l'agrégation n'est pas due aux cellules elles-mêmes, mais à un facteur associé aux cultures de cellules malignes et qui serait absent dans les cellules normales. Ces facteurs pourraient être : des bactéries, des mycoplasmes, des virus.

- Les bactéries : l'infection bactérienne est un problème majeur de la culture des tissus. S'il est relativement facile d'éliminer une contamination grossière, il est à peu près impossible de s'assurer que des cellules ne transportent pas des bactéries à l'état latent. Dans la mesure du possible, la stérilité des souches utilisées a été vérifiée et nous pensons qu'elles peuvent être considérées comme abactériennes. Les antibiotiques utilisés pour l'entretien des milieux ne modifient pas l'agrégabilité des cellules car des lignées cultivées parallèlement sans antibiotiques donnent les mêmes résultats.

- Les mycoplasmes sont un contaminant très répandu de la plupart des lignées cellulaires dans le monde. Ils pourraient modifier les propriétés agrégatives des cellules, soit en se fixant à leur périphérie, soit en modifiant leur métabolisme. Nous avons essayé de détecter d'éventuels mycoplasmes par l'ensemencement du surnageant et des cultures sur des géloses préparées selon la technique de CHANOCK (74).dans des boîtes de pétri hermétiquement fermées et à 37°. Ces recherches effectuées à plusieurs reprises

sont restées infructueuses. Cependant, il est évident que des résultats négatifs ne permettent pas d'éliminer ces micro-organismes, d'autant que nous avons observé au microscope électronique des images pouvant évoquer des mycoplasmes à l'intérieur des cellules. Mais là, comme pour les bactéries , il faudrait admettre que seul l'un des types cellulaires malin ou normal est contaminé, ce qui est tout à fait improbable.

-Un problème beaucoup plus complexe est soulevé par l'existence possible de particules d'allure virale dans les cultures cellulaires :

1 - Les cellules CT4 ont été obtenues in vitro après transformation par le virus du sarcome de Rous (souche Bryan). La réalité de la transformation par ce virus est confirmée par l'existence de l'antigène viral dans les cellules (A. TEYSSIE. et coll. 75). De nombreuses recherches de virions éventuellement associés à ces cellules transformées ont été constamment négatives et en particulier il n'a pas été possible de retrouver, les particules d'aspect viral au microscope électronique.

2 - La transformation des cellules N1 a été spontanée , c'est-à dire que son étiologie est inconnue. Il est très possible qu'il s'agisse d'une transformation par un virus présent dans certains lots de sérum ou d'extraits embryonnaires utilisés lors de l'isolement de cette lignée. Cependant, il n'existe aucun argument publié capable de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, en particulier il n'existe aucun travail où l'on aurait cherché à détecter les antigènes des virus oncogènes de la souris ou du poulet. D'autre part, les tumeurs produites chez les souris C3H par l'inoculation de cellules N1 ne semblent pas contenir de virions. Mais des études que nous avons faites récemment avec Melle HAGUENAU et Mme ARNOULT ont révélé la présence de parti-

cules d'aspect viral , soit à l'extérieur des cellules près des membranes, soit dans des vacuoles cytoplasmiques. Ces particules semblent naître par bourgeonnement des membranes vacuolaires ou cytoplasmiques . Ces résultats sont à rapprocher de ceux rapporter par DALES (76) à propos de la lignée L de EARLE et de certains de ces sub-clones . Même si la présence de ces particules d'allure virale est confirmée, leur signification demeure encore énigmatique. Tout d'abord, il ne nous est pas possible pour l'instant d'affirmer que les cellules normales N2 en sont régulièrement dépourvues et que par conséquent ces particules sont spécifiquement associées aux cellules malignes.

Ensuite, les rapports de ces éventuels virus avec la malignité demeurent très incertains et nous avons vu qu'il n'existait aucune preuve de conversion virale. Il est intéressant de noter que des particules d'allure identique sont associées aux cellules du clone M6. Mais là aussi , on ne peut exclure l'hypothèse de la transmission du virus associé aux cellules N1, lors de l'hybridation, sans que ce virus participe à la malignité cellulaire. Si ces particules n'ont peut-être aucun rapport avec la malignité, leur fole dans l'agrégation est plus difficile à éliminer. Nous ne pensons pas que ces "virus" pourraient contribuer à l'agrégation des cellules, comme les virus de la grippe à l'agglutination des globules rouges. Ils ne pourraient agir que de façon indirecte en modifiant un mécanisme cellulaire gouvernant l'agrégation.

III. ADHERENCE INTERCELLULAIRE ET ADHESIVITE AUX SUBSTRATS.

Ainsi, il paraît assuré que les propriétés agrégatives des cellules tumorales sont bien liées aux qualités biologiques des cellules elles-mêmes. Cette observation soulève immédiatement une question : quelle

en est la signification ? Dire que ces propriétés sont liées à une augmentation de l'adhérence mutuelle des cellules néoplasiques pourrait paraître un truisme, si des travaux antérieurs n'avaient démontré exactement l'inverse. Dans une série d'études commencées en 1944, COMAN (77) a montré par des techniques de micromanipulation que des cellules normales épithéliales étaient mutuellement plus adhérentes que des cellules néoplasiques provenant des mêmes tissus (lèvres et col utérin.). L'adhérence a été mesurée par la force nécessaire pour séparer deux cellules, l'une étant fixe et l'autre entraînée par une très fine aiguille reliée au manipulateur. Cette force, donc cette adhérence mutuelle est de trois à six fois plus importante pour les cellules normales que pour les cellules néoplasiques. Cependant, COMAN a distingué récemment (1961, 78) une deuxième propriété de surface des cellules qu'il appelle "stickiness" que l'on pourrait traduire littéralement par "collage" ou propriété adhésive. Or cette propriété est inverse de l'adhérence mutuelle. Autrement dit, les cellules néoplasiques ont une adhésivité aux substrats (verre ou silicone) beaucoup plus importante que les cellules normales. Il est très difficile de comparer les forces qui entrent en jeu dans l'adhérence mutuelle et dans l'adhésivité aux substrats.et d'avoir un ordre de leur grandeur relative, mais il semble qu'elles sont en proportion inverse.COMAN attribue à la diminution du calcium dans les tumeurs la moindre adhérence des cellules néoplasiques, et à des substances secrétées par les cellules (mucopolysaccharides ?) leur plus grande adhésivité aux substrats. Enfin il fait jouer à ces propriétés particulières un grand rôle dans l'invasion tumorale, permise par l'adhérence mutuelle très faible des cellules néoplasiques. Les métastases s'expliquent du fait de l'adhésivité accrue aux substrats.

Il nous appartient de tenter d'expliquer la discordance entre les résultats de COMAN et les nôtres. Tout d'abord par le choix des cellules : celles-ci sont entièrement différentes par leur origine et leur mode d'obtention. COMAN a prélevé des cellules par grattage. On ignore si à cet égard les cellules présentent un comportement identique à chaque niveau. On sait la dépendance étroite des cellules néoplasiques vis-à-vis du stroma et de l'irrigation vasculaire. Il n'est pas exclu que les propriétés décrites par COMAN soient limitées aux cellules superficielles souvent pycnotiques et en voie de dégénérescence. L'absence d'autres travaux de cette nature indique la difficulté qu'il y a à les reproduire. Il est frappant de constater que l'adhérence mutuelle et l'adhésivité aux substrats sont, grossièrement, inversement proportionnelles et il n'est pas impossible que les forces mesurées par COMAN, lors des micromanipulations soient l'expression de l'adhésivité aux substrats, ces forces étant beaucoup plus importantes (pour une raison non déterminée) lorsque les cellules adhèrent peu entre elles. COMAN signale toutefois (78) un point curieux et très important : lorsque des cellules néoplasiques, après avoir été séparées, sont réapprochées, elles deviennent très fortement adhérentes, beaucoup plus que les cellules normales. Il paraît donc fort difficile de séparer les deux propriétés d'adhérence mutuelle et d'adhésivité aux substrats que cet auteur déclare cependant indépendantes, tant qu'on ne pourra leur octroyer un support chimique ou physique précis.

Le problème général de l'adhésivité aux substrats, si importante en cultures de tissu, a fait l'objet de nombreux travaux non univoques. A.C. TAYLOR (13) a montré que les cellules s'attachent avec une extraordinaire

rapidité au verre, pourvu qu'il soit parfaitement propre et chimiquement neutre.et , condition fondamentale, si le milieu ne contient pas de sérum. Dans ces circonstances, près de 100 % des cellules sont attachées au verre en dix minutes. D'ailleurs ce délai n'est pas le temps nécessaire à l'attachement mais à la sédimentation des cellules : en effet, elles s'attachent au verre dès qu'elles ont pris contact avec lui. Un fait très important est que, dans ces conditions, le type cellulaire est indifférent. Toutes les cellules s'attachent avec la même rapidité. Il ne semble pas que l'auteur ait comparé des cellules normales et néoplasiques, mais il a remarqué que des cellules mortes et même des grains de carbone peuvent s'attacher au verre.dans des conditions analogues. Par contre, lorsque les cellules sont suspendues dans un milieu contenant du sérum, ou lorsque la surface du verre est revêtue d'un film de sérum ou de fibrine, l'adhésion cellulaire est considérablement retardée : 30 % des cellules seulement sont attachées au substrat en 60 minutes et seules les cellules vivantes détiennent cette propriété. En fait, ce retard est dû à ce que les cellules restent en suspension, ne floculent pas; l'attachement proprement dit étant très rapide. Il est remarquable d'observer que dans ces conditions l'adhésion au verre est indépendante de facteurs tels que le pH, la présence de versène , l'absence de calcium ou l'addition de trypsine au milieu. Certains de ces résultats se trouvent cependant contredits par ceux de CURTIS (6) et de L. WEISS (79). Ces auteurs ont montré notamment que les ions calcium, en réduisant l'épaisseur des couches électriques négatives du substrat et des cellules, facilitaient l'adhésion de celles-ci. Ces différences peuvent être dues à des conditions techniques autres: dissociation cellulaire, type de la culture ou de la primo-explantation, nature exacte du substrat , composition du milieu...

De plus, les cellules peuvent contribuer à l'interface avec le substrat , par la présence d'exsudats , comme nous l'avons vu antérieurement.

C'est dire que l'interprétation des résultats , des études de l'adhésion des cellules à un substrat requièrt une extrême prudence.et ne prend de valeur que si ces études sont réalisées dans des conditions rigoureusement comparables. C'est en raison de toutes ces difficultés que nous pensons que l'étude de l'adhérence mutuelle des cellules par les techniques de micromanipulation ou bien de l'adhésivité aux substrats n'est pas un moyen approprié pour connaître les propriétés biologiques de la surface cellulaire. De plus ces travaux n'abordent que très indirectement le mécanisme de la cohésion cellulaire.

IV. LA STRUCTURE DE L'AGREGAT.ET LES CONDITIONS DE L'AGREGATION.

L'étude de la structure des agrégats obtenue par l'agrégation de lignées cellulaires apporte plus d'éléments d'information : il s'agit d'une population cellulaire tout à fait pure et on est assuré que les propriétés mises en évidence sont le fait d'un type cellulaire bien déterminé. D'autre part, cette technique permet de sélectionner les cellules qui sont les plus adhérentes et d'établir ainsi un rapport direct entre l'adhérence mutuelle des cellules et la structure de l'agrégat. Les différentes techniques que nous avons utilisées pour mettre en évidence le mécanisme des liaisons cellulaires nous ont approté des informations complémentaires. Il apparaît que les ions bivalents ne sont pas indispensables à l'agrégation des cellules N1 bien qu'on ne puisse exclure la présence de ce cation à l'état de trace.

Ce fait valable pour les cellules N1 n'est peut-être pas valable pour les autres lignées , en particulier les lignées épithéliales (Hep, KB). Il apparaît également que l'absence totale de protéines sériques n'empêche pas l'agrégation. Cette constatation est importante à la lumière des travaux de CURTIS (21) qui, comme nous l'avons vu, pense avoir isolé une protéine sérique inhibant l'agrégation et dont la destruction préalable à 38° est indispensable.pour que l'agrégation ait lieu. Mais là non plus on ne peut éliminer la présence de traces de sérum, car les cellules sont cultivées depuis toujours dans un milieu contenant du sérum et il est très probable qu'elles peuvent être partiellement en recouvertes. Ces traces de sérum sont peut-être suffisantes à la néosynthèse d'un matériel de la membrane plasmique ou d'éventuelles substances extra-cellulaires.

Nous avons demandé aux techniques histologiques classiques et à la microscopie électronique des informations plus précises sur la structure de l'agrégat. Ces techniques nous ont montré que les agrégats avaient l'apparence de tissus.A la fois sur les coupes histologiques et sur les images ultra-structurales, il n'est pas possible à un observateur non prévenu de dire qu'il s'agit d'un agrégat cellulaire et non pas d'un tissu. Histologiquement l'agrégat a une forme le plus souvent ovoïde et il est bordé de cellules aplaties qui simulent un épithélium. Les limites cellulaires sont nettes et aussi rapprochées que dans un tissu. C'est l'histo-chimie qui permet de mettre en évidence les différences entre l'agrégat cellulaire et les tissus car il n'y a ni collagène ni réticuline , encore qu'il nous faille faire des réserves sur ces résultats négatifs, car les techniques histologiques employées ne sont peut-être pas valables pour notre matériel et il est

possible que ces substances apparaissent après un temps de culture très prolongé. Il semble par contre quil existe des mucopolysaccharides à la surface et entre les cellules . Il s'agit peut-être du matériel extra-cellulaire diffusible.

L'étude ultra-structurale montre que les membranes cellulaires applaties sont très étroitement accolées , séparées par une distance voisine de celle que l'on rencontre dans un tissu. Cependant cette distance ne semble pas descendre jusqu au 10 Å qui sont nécessaires pour qu'un pont calcique puisse unir les cellules. Certains pensent quepour des raisons théoriques , il n'est pas impossible que la distance inter-cellulaire puisse être égale à 10 Å au sommet des micro-villosités. Mais il ne s'agit là que d'une hypothèse qu'aucune image n'est venue confirmer.

Les techniques de dissociation des agrégats ont montré leur très grande cohérence : en effet ils résistent autant qu'un tissu aux forces de dispersion.et sont aussi sensibles qu'eux aux enzymes protéolytiques, ce qui peut faire penser que le matériel extra-cellulaire est protéique ou mucoprotéique.

V. FACTEURS DE L'ADHERENCE INTERCELLULAIRE.

A) Forces physiques. Une première théorie reprise par CURTIS (6) fait appel à un mécanisme essentiellement physique. Elle applique le système de Verwey et Overbeeck sur l'interaction des surfaces à l'adhésion intercellulaire. D'après cette théorie, des surface de constitution identique s'attirent mutuellement par les forces de Van der Waals. Mais ces forces d'attraction intermoléculaires ne peuvent devenir suffisamment intenses que si les

forces de répulsion des charges électrostatiques de surface permettent une approche suffisante des cellules. CURTIS et L. WEISS (80) pensent que le rôle des liaisons calciques est justement de réduire l'épaisseur de ces couches négatives. Le calcul montre que de tels systèmes sont stabilisés à une distance mutuelle d'environ 150 Å, ce que confirme les données de la microscopie électronique. Cette théorie peut expliquer l'arrangement tout à fait initial des cellules, mais ne tient compte ni de la possibilité d'agrégation dans un milieu sans calcium, ni de l'existence de matériel protéique intercellulaire. Deux autres faits sont difficilement compatibles avec cette théorie : il est à peu près impossible de dissocier mécaniquement l'agrégat en cellules ; les cellules N1 ont une charge électrique négative plus importante que les cellules normales. et donc développent des forces de répulsion électrostatiques plus élevées.

B) Rôle du calcium .

Le rôle du calcium dans l'adhérence cellulaire a été amplement discuté : il est certain que le calcium intervient dans les liaisons des cellules embryonnaires et en particulier dans les embryons d'Amphibiens surtout au stade de blastula. Tous les travaux initiaux sur la désagrégation et la réassociation cellulaires ont été faits en utilisant des tampons sans calcium ni magnésium (HOLTFRETTER , 3). MOSCONA utilise également un tel tampon pour dissocier (moins partiellement) les embryons d'oiseaux, alors que d'autres utilisent des chélateurs calciques.(E.D.T.A.)D'autre part, nombre d'auteurs font jouer un rôle important au calcium dans l'adhésion des cellules aux substrats; il est relativement aisé de dissocier les cellules en culture par EDTA , encore que ces dissociations soient souvent difficiles et incomplètes surtout si la

culture est ancienne. Enfin COMAN (81) prétend avoir dissocié des tissus grâce à l'action d'un tel chélateur. On peut rapprocher de ces faits les travaux qui ont montré que le taux du calcium était diminué dans les tissus néoplasiques (82).

Mais si le rôle du calcium est possible et même probable dans les liaisons intercellulaires des tissus adultes, il est certain qu'il n'est pas exclusif.

C) Le ciment intercellulaire.

D'autres hypothèses font intervenir un matériel protéique ou gluco-protéique à la surface des cellules pour expliquer leur adhésion. Dans nos expériences, l'étude histologique et ultrastructurale, la dissociation enzymatique , voire d'isolement d'un matériel extra-cellulaire sont compatibles avec cette hypothèse. En tout cas aucun fait n'est incompatible avec elle. Les travaux d'EASTY et MUTOLO (83) se rapprochent de nos observations : ces auteurs pensent que dans les tissus normaux et néoplasiques, un ciment protéique est probablement beaucoup plus important que le calcium pour maintenir les adhésions cellulaires. On peut en rapprocher les travaux des GASIC (84) et ceux de LANGLEY et AMBROSE (85) sur la richesse en acide sialique de la surface de certaines cellules néoplasiques.

D) A la lumière de tous ces faits , on peut concevoir que l'agrégation cellulaire a lieu en plusieurs étapes, chacune étant déterminée par des facteurs différents. Les forces physiques de surface peuvent expliquer l'adhésion cellulaire initiale dans les agrégats ; l'intervention des ions divalents est également possible mais ne semble pas obligatoire.

Cependant, l'intensité de l'adhérence mutuelle des cellules nécessite peut-être un troisième facteur : la sécrétion d'un facteur protéique ou muco-protéique à la surface des cellules ou dans l'espace inter-cellulaire.

VI. AGREGATION CELLULAIRE ET MALIGNITE.

La question qui se pose maintenant est de savoir si le phénomène d'agrégation est conditionné par les potentialités de malignité des cellules. Il ne nous est pas possible pour l'instant de répondre par des faits, mais seulement par des hypothèses. Nous avons vu que l'agrégation des cellules N1 était très irrégulière, c'est-à-dire que cette population cellulaire contient des cellules d'adhésivité très différente. D'autre part, quand on injecte des cellules à un animal pour vérifier leur malignité on utilise cette même population cellulaire hétérogène. Or, il est possible que la tumeur prenne naissance à partir de certaines cellules seulement et que les autres soient normales ou aient un potentiel malin très limité. Il n'est pas interdit de penser que les cellules malignes sont justement celles qui sont les plus adhésives. Cette hypothèse peut être vérifiée en développant des clones, à partir des cellules à faible adhésivité et en éprouvant leur malignité.

B) Le phénomène d'agrégation des cellules malignes est-il limité ou général ? Il est évident que ce problème ne peut pas être résolu actuellement. Cependant ,on peut noter que jusqu'à présent on n'a pas décrit l'agrégation des cellules réputées normales, non transplantables. Un certain nombre des lignées utilisées par MOSKOWITZ (9 - 64) provenait d'un tissu normal, mais leur transformation pendant la culture in vitro est très possible et cette éventualité n'a pas été étudiée. D'autre part, DODSON (86)

vient de décrire, avec des techniques un peu différentes des nôtres, l'agrégation de cellules dont l'origine est un tissu néoplasique humain. Or ces cellules forment des agrégats de forme et de taille très variées . Mais l'auteur ne disposait pas de cellules normales issues du même organe et qui aurait permis une comparaison .

Il faut d'ailleurs insister sur le fait qu'il est difficile d'avoir deux types de cellules dont l'un ne diffère de l'autre que par un seul caractère, la malignité. Il peut s'agir ou bien d'une lignée transformée spontanément ou à la suite d'un traitement oncogène (le plus souvent par un virus) ou bien d'une souche cellulaire devenue maligne à la suite d'une transformation spontanée ou virale. Mais dans ce dernier cas, il est pratiquement impossible de comparer les deux types cellulaires sur une longue période, car la souche a une durée de vie limitée (un an au maximum dans le cas des cellules humaines) .Ainsi il n'est pas possible de comparer des cellules normales et malignes ayant toutes les deux le nombre de génération et ce point nous paraît très important. C'est pourquoi nous pensons que seule la comparaison de deux lignées est suffisamment rigoureuse pour permettre l'interprétation des résultats. Il faut également remarquer que la tendance spontanée à l'agrégation de certaines lignées cellulaires est un phénomène courant, dont la signification et le rapport avec le caractère malin des cellules ne semblent pas avoir reçu l'attention qu'ils méritent jusqu'à maintenant. Par exemple, il est extrêmement difficile d'avoir une suspension uniformément dispersée et formée d'éléments isolés avec les cellules N1, celles-ci se groupant presque toujours spontanément en amas de quelques cellules qui adhèrent aux substrats et forment des colonies du type rough, c'est-à-

dire formées de foyers de cellules . Même si les cellules ont été parfaitement dispersées elles ont tendance à se regrouper après l'adhésion aux substrats. Ce phénomène n'est pas observé avec les cellules N2.

C) A propos des relations de l'agrégation cellulaire et de la malignité, il est très important de noter que, in vivo, les tumeurs malignes sont souvent formées, dans leur premier stade , de "nids de cellules" c'est-à-dire d'agrégats. Il semble donc que les techniques expérimentales reproduisent un phénomène qui apparaît spontanément dans l'histogénèse tumorale. Cette similitude de comportement a été remarquée pour la première fois par LEIGHTON (8 - 87)qui a cultivé des cellules néoplasiques ou réputées telles dans un substrat tri-dimensionnel en éponge de cellulose. Les cellules y forment spontanément des agrégats qui ressemblent aux "nids" des tumeurs in vivo. L'auteur a remarqué que les cellules malignes possédaient à elles seules cette propriété, en l'absence de stroma..

Il est donc possible d'imaginer que c'est à la faveur de l'acquisition de la propriété agrégative que les cellules néoplasiques ont la possibilité de former des tumeurs. D'autre part, LEIGHTON, MOSKOWITZ et nous-mêmes avons observé que les agrégats sont capables de se "reproduire". Un agrégat mature, en général cultivé depuis plusieurs semaines, se fragmente et les fragments reconstituent une structure identique à celle de l'agrégat originel. L'agrégat se comporte donc (dans certains cas) comme une unité biologique autonome, capable de "reproduction". De plus ce phénomène de la réplication des agrégats peut expliquer la fragmentation des tumeurs et la formation à distance de métastases identiques à la tumeur-mère.

VII - ANOMALIES BIOCHIMIQUES DES CELLULES MALIGNES ET AGREGATION.

La première particularité biochimique des cellules néoplasiques fut découverte par WARBURG (88) qui montra un métabolisme glucidique important dû à la persistance de la glycolyse aérobie ; mais des exceptions ont été trouvées et récemment (89) on a interprété cette augmentation de la glycolyse comme un effet de la croissance plus rapide des cellules tumorales et non comme une anomalie spécifique de la malignité.

Une autre voie de recherche a été récemment explorée , celle desaanomalies de la surface cellulaire. Nous ne reviendrons pas sur les travaux de GASIC et de LANGLEY (84-85) que nous avons déjà cités.

KALCKAR (90) a montré que plusieurs cellules néoplasiques (dont la L d'EARLE voisine de la cellule N1) avaient perdu l'activité épimérasique permettant la transformation du glucose en galactose. La conséquence de ce fait semble importante : amincissement des composés galactosés de la surface cellulaire et en particulier modification possible de la structure antigénique. Or ces modifications antigéniques ont été démontrées par plusieurs auteurs (91-92-93-94) à propos de différentes tumeurs et lignées de cellules tumorales. Il s'agit en règle de la perte d'antigènes de surface. Ces observations sont peut-être en rapport avec l'anomalie enzymatique décrite par KALCKAR. Elles viennent également à l'appui de la théorie de GREEN (95) selon laquelle la carcinogénèse est due à la perte d'une structure antigénique lipoprotéique spécifique du tissu. et probablement située au niveau des membranes cellulaires.

D'autre part, des auteurs ont observé des modifications des phospho-lipides des membranes des cellules tumorales par rapport à des témoins

normaux : changement du taux de l'acide stéarique par rapport à l'acide oléique ou isolement d'un phospho-lipide absent des cellules normales (96-97,98).

Enfin PARDEE (99) a suggéré que la croissance cellulaire continue des cellules néoplasiques dépend de la régulation par des substances extérieures à la cellule et que ces inhibiteurs de la croissance cellulaire ne peuvent pénétrer dans les cellules néoplasiques en raison de leur surface modifiée.

Il est possible que le mécanisme biochimique de l'adhérence accrue des cellules néoplasiques soit secondaire à l'une des modifications décrites, en soit en quelques sorte la conséquence. Mais il est tout aussi probable qu'il s'agisse d'un mécanisme différent et indépendant. Quel qu'il soit ce mécanisme peut être dû soit à une interférence métabolique d'un ou de plusieurs enzymes, soit directement à un défaut enzymatique héréditaire. En effet la possibilité d'agrégation cellulaire est transmise héréditairement. C'est une propriété stable que nous avons vérifiée à un an et demi d'intervalle . Ainsi un désordre génétique quelles qu'en soient la nature et la cause est peut-être à l'origine des modifications biologiques des cellules néoplasiques accompagnant le phénomène d'agrégation.

VIII. Un autre problème important est de concilier les faits que nous avons montrés à propos de l'adhérence des cellules néoplasiques avec la perte de l'inhibition de contact que ces cellules présentent entre elles et vis-à-vis de cellules normales. Rappelons que l'inhibition de contact est une propriété des cellules en culture qui consiste dans l'arrêt des mouvements cellulaires lorsque deux populations arrivent au contact l'une de l'autre. Cette inhibition du mouvement par le contact est propre aux cellules normales (ABERCOMBRIE 100)

c'est l'explication du fait que ces cellules forment en culture une couche (presque) strictement monocellulaire. Au contraire, pour ces mêmes auteurs les cellules néoplasiques perdent l'inhibition de contact, ce qui explique qu'elles peuvent croître en foyers , en couches pluri-cellulaires. Les mouvements des cellules néoplasiques ne sont inhibées ni par le contact de cellules identiques ni par celui de cellules normales. C'est là une explication possible de l'invasion des tissus normaux par les cellules malignes. Or ce phénomène est expliqué en général par la diminution de l'adhérence mutuelle des cellules néoplasiques. Cette thèse n'est pas sans rencontrer quelques objections : la perte de l'inhibition de contact des cellules néoplasiques n'est peut-être pas aussi générale qu'on l'a cru tout d'abord (101) ; des cellules apparemment normales (cellules diploïdes humaines) perdent au moins partiellement , l'inhibition de contact quand les cultures sont riches (observation personnelle). D'autre part il est possible que la perte d'inhibition de contact soit due non pas à une diminution de leur adhérence mutuelle , mais au contraire à une augmentation de leur adhésivité aux substrats.

IX. C'est sur un plan tout à fait différent que nous allons situer le problème de l'agrégation des cellules malignes . Nous avons vu combien il était difficile de reconnaître la transformation maligne d'une souche ou d'une lignée cellulaire, la transplantation à l'animal d'origine étant le seul caractère absolu de malignité. Il est évident que la technique n'est pas toujours possible et qu'elle est souvent longue et difficile . Aussi a-t-on essayé de développer d'autres techniques plus simples permettant avec un bon degré d'approximation de savoir si l'on a affaire à des cellules normales ou malignes. La constatation de la perte d'inhibition de contact est certes le moyen le plus

simple de recpnaître des cellules "transformées". Ce phénomène peut-être en rapport avec l'augmentation de la sialo-mucine de la surface cellulaire (102) n'est pas d'une fidélité absolue comme nous l'avons vu.

La croissance de cellules "transformées"et malignes dans une gélose molle (103) est d'autant plus intéressante qu'elle semble se rapprocher du mécanisme de l'agrégation par rotation. Les auteurs ont en effet remarqué que des cellules tumorales (BHK 21) transformées par le virus du polyome,forment dans un tel milieu des colonies bien individualisées , alors que les cellules normales ne peuvent avoir de croissance coloniale. Il est possible que c'est en raison de l'augmentation de leur adhérence mutuelle que des cellules tumorales peuvent former une colonie , les cellules normales beaucoup moins adhérentes étant maintenues dispersées par ce milieu particulier .

L'agrégation par rotation est un autre moyen techniquement facile à réaliser , reproductible et quantifiable de caractériser des populations cellulaires normales et néoplasiques. Cet aspect pratique mériterait considération à lui seul .

X. Enfin on peut dire qu'un agrégat de cellules tumorales formé d'une population cellulaire parfaitement homogène ou mélangée en proportions voulues à des cellules ayant des origines et des fonctions diverses est un moyen d'étude plus proche de la physiologie tumorale in vivo que les cellules en culture. On peut donc imaginer que les agrégats seront utilisés pour des études telles que les rapports avec des substrats divers, la croissance et l'invasion in vivo ; l'invasion in vitro par des cellules diverses ; étude pharmacodynamique de substances anti-tumorales.

- C O N C L U S I O N S -

I - L'agrégation cellulaire est un phénomène biologique que l'on observe avec des populations de cellules embryonnaires à un stade précoce de leur évolution et avec des cellules maintenues en culture "in vitro".

L'étude des cellules embryonnaires a permis de définir la nature, l'origine, le stade du développement des cellules susceptibles de s'agréger ; les conditions de culture, les divers facteurs extérieurs physiques et chimiques impliqués dans le phénomène.

Certaines hypothèses concernant les rapports de l'agrégation avec les processus d'histogénèse et d'organogénèse ont été émises à propos de ces observations, sur la base de l'existence d'une affinité de tissus, même dans des cultures interspécifiques.

II - Dans des études récentes, il a été montré que le phénomène d'agrégation cellulaire est observé avec des cellules de Mammifères (dont des cellules humaines) en culture continue. Il s'agit de lignées aneuploïdes, souvent mal définies quant à leur malignité.

Les travaux réalisés sur ce sujet ont été souvent effectués dans des conditions-standard et n'apportent que peu de précisions sur les

différents paramètres expérimentaux.

III - Dans des recherches personnelles, nous nous sommes attachés à étudier l'agrégation cellulaire dans les conditions suivantes :

Nous avons choisi les lignées cellulaires ci-après :

- La lignée ER mise en culture à partir d'un embryon de rat total ne donne pas de tumeur après inoculation à l'animal homologue.

- La lignée CT4 a été obtenue par "transformation" de la lignée ER par le virus du sarcome de ROUS. Elle provoque près de 100 % de tumeurs.

- La lignée N1

- et la lignée N2 de SANFORD sont nées d'une même cellule clonée. Les cellules N1 se sont "converties" spontanément à la malignité.

- Le clone M6 de BARSKI est né de l'hybridation des deux cellules précédentes et se comporte comme une lignée maligne.

Nos observations ont porté sur le comportement parallèle d'une lignée maligne et de la lignée non maligne correspondante, dans des conditions expérimentales identiques :

- Les lignées ER et N2 ne forment que de minuscules agrégats (Clumps) lâchement associés.

- Les lignées CT4 et N1 forment au contraire de volumineux agrégats compacts et cohésifs.

- Le clone M6 se comporte comme les lignées malignes.

L'étude de la structure des agrégats de cellules N1 a été réalisée en microscopie optique et électronique.

L'histologie a montré des cellules normalement constituées,

prenant les colorations habituelles et organisées en couches superficielles aplaties, entourant un centre souvent nécrosé.

Des colorations spéciales ont mis en évidence une substance intercellulaire qui, selon la topographie, prend le PAS ou est argentaffine.

L'étude ultrastructurale a montré des différences notables au niveau des jonctions des membranes.

- Les cellules N2 ont une activité de surface importante avec des villosités et des lacs intercellulaires.

- Dans les agrégats de cellules N1, les membranes cellulaires sont acollées sur une plus ou moins grande surface selon l'âge de l'agrégat, avec formation de desmosomes ; la richesse en polyribosomes est à souligner ; de plus, ces cellules contiennent de nombreuses particules d'aspect viral.

Nous avons étudié les différents paramètres de l'agrégation des cellules N1 et observé que l'agrégation était maximale quand les cellules étaient en phase de croissance exponentielle, peu traumatisées par la dissociation et cultivées dans un milieu synthétique complet, enrichi par certains sérums animaux, à la température de 38°.

Nous avons montré que l'agrégation de cellules N1 était possible , mais moins nette, en l'absence de quantités appréciables d'ions divalents et de sérum.

IV. Le mécanisme du processus d'agrégation et ses relations avec la malignité sont discutés à la lumière des données de la littérature et sur la base de nos observations personnelles.

*
****

- BIBLIOGRAPHIE -

1 -ROUX, W. (1894) . ARCH. ENTWMECH. 1, 43.

2 - WILSON, H.V. (1907) . J. EXP. ZOOL. 5, 245.

3 - HOLTFRETER, J. (1943) J. EXP. ZOOL. 93, 251.

4 -MOSCONA, A. (1952) . EXP. CELL. RES. 3, 535.

5 - WEISS, P (1961) - EXP. CELL. RES. SUPPL. 8, 260.

6 - CURTIS, AS.G. (1962) - BIOL. REV. 37,82.

7 - TRINKAUS, J.P. (1961), sur "La Culture Organotypique". (Coll. Int. C.N.R.S.) p; 209, PARIS.

8 - LEIGHTON , j (1957) J. NATL. CANCER INST., 19, 607.

9 - MOSKOWITZ, M. (1963) . NATURE (LONDON), , 854.

10-EBELING, A.H. et FISCHER . A. (1922) - J. Exp. Med. 36, 285

11-MOSCONA,A. (1957). Proc. NAT. ACAD. WASH, 43, 184.

12-ABERCOMBRIE, M. (1961), CANAD. CANCER CONF. ,4, 101.

13-TAYLOR, A.C. (1961). EXP. CELL. RES. SUPPL. 8, 154.

14-RUTSTEIN, D., INGENITO, E.F., CRAIC, J.M. et MARTINELLI, M; (1958) LANCET 545.

15-GARBER, B (1953). EXP. CELL. RES. , 5, 132.

16-WEISS, P (1945). J. EXP. ZOOL. 100, 353.

17-EARLE, W. (1962)in "Analytical Cell. Culture" NAT. CANCER INST. MONOGRAPH. N°7, p. 213, BETHESDA.

18 - WEISS, L. (1961). EXP. CELL. RES., 25, 504.

19 - MOSCONA, A. (1960) in "DEVELOPING CELL. SYSTEMS AND THEIR CONTROL" (D. RUDNICK Ed.), Ronald Press, NEW-YORK.

20- AMBROSE, E.J. et JONES, P.C.T. (1961) MED. BIOL. ILLUSTR. 11(104)

21 - CURTIS , A.S.G., GREAVES, M.F. (1965). J. EMBRYOL. EXP. MORPHOL. 13, 309.

22 - MOSCONA, A.A. (1961) - Exp. CELL. RES. 22, 455.

23 - AUERBACH, R.(1961), DEV. BIOL.,3, 336.

24 - MOSCONA, AA. (1965) in "CELLS AND TISSUES IN CULTURE". E.N. WILLMER (ed.), Acad. Press. NEW YORK.

25 - KURODA, Y (1963), EXP. CELL. RES. 30, 446.

26 - MORRIS C.C. et GOODMAN, C.C. (1960)-NATURE (LONDON) 188, 407.

27 - HOGMAN , C.F., (1960), EXP. CELL. RES., 21, 137.

28 -ENDERS, J.F., WELLER, T.H. et ROBBINS, F.C.(1949), SCIENCE 109, 85.

29 - HOLLAND, J.J. (1961) - VIROLOGY, 15, 312.

30 - EAGLE, H. (1955) - SCIENCE, 122, 501.

31 - FISCHER , H.W., PUCK J.J. et SATO G. (1958) - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 44, 4.

32 - WILLMER, E.N. (1961). BIOL. REV. 36, 368.

33 - MOSCONA, A. et MOSCONA, H. (1966) - EXP. CELL. RES. , 41, 697.

34 - CURTIS, ASG. (1960), AM. NAT. 94, 37.

35 - STEINBERG, M.S. (1958). AM. NAT. 92, 65.

36 - MOSCONA , A.A. (1962). J. CELL. COMP. PHYSIOL. SUPPL. 1, 60, 65.

37 - SPIEGEL, J. (1954), BIOL. BULL. 107, 130.

38 - HUMPHREYS, T. (1963) - DEV. BIOL. 8, 27.

39 - GARBER, B. (1963) - DEV. BIOL. 7, 630.

40 - MOSCONA, M.H. et MOSCONA, A.A. (1963), SCIENCE, 142, 1070.

41 - WEISS, P. et JAMES, R. (1955) . J. EXP. ZOOL, 129, 607.

42 - TRINKAUS J.P. (1956) - AM. NAT. 90, 273.

43 - HADORN, E. , ANDERS, G. et URSPRUNG, H. (1959). J. EXP. ZOOL.142,159.

44 - WEISS, P. et TAYLOR, AC. (1960), PROC. NAT. ACAD. SCI. WASH. 46, 1177.

45 - LESSEPS, R.J. (1963), J. EXP. ZOOL. 153, 171.

46 - DEHAAN, R.L. (1958), in "SYMPOSIUM ON THE CHEMICAL BASIS OF DEVELOPMENT" p. 339, John Hopkins,-Press. , BALTIMORE.

47 - WEISS, P. (1958). INT. REV. CYT., 7, 391.

48 - STEINBERG, M. (1963), SCIENCE 141, 401.

49 - WOLFF, EL. (1954). BULL. SOC. ZOOL. FR. 79, 357.

50 - HAYFLICK, L. (1961) - EXP. CELL. RES. 26, 585.

51 - ROTHSCHILD, L. et FEBVRE, H. (1963) - C.R. ACAD. SCI. PARIS, 257,2350.

52 - SANFORD, K.K., LIKELY, G.P., et EARLE, W.R. (1954), J. NAT. CANCER INST. 15, 215.

53 - SCALETTA, L.J. et MPIHKUBSI, B. (1965), NATURE, LONDON - 205-1169.

54 - BARSKI, G. (1961) - C.R. ACAD. SCI. PARIS, 253, 1186.

55 - FOLEY, G.E., HANDLER, A.H., ADAMS, R.A. et CRAIG J.M. -NAT.CANCER (INST.) MONOG. N° 7, p. 173.

56 - MOORHEAD, P.S. (1965), EXP. CELL. RES. 39, 190.

57 - YERGANIAN, G. (1963) in "SYMPOSIUM HUMAN DIPLOID CELL. STRAINS OPATIJA, P. 438.

58 - BERNSTEIN, L. (1958), ANN. OF. N.Y. ACAD. SCI'. 76, 549.

59 - HAUSCHKA, T.S. (1961), CANCER RES. 21, 957.

60 - HULL, R.N. (1962) . J. EXP. MED. 115, 903.

61 - HAYES, J.R., R.L. (1965), EXP. CELL. RES., 37, 1.

62 - PEJSACHOWICZ, B. , HALPERN, B.N. , FEBVRE, H.L. et BARSKI, G. (1964), C.R. ACAD. SCI. PARIS - 259, 4894

63 - HALPERN, B.N., PEJSACHOWICZ, B., FEBVRE, H.L. et BARSKI, G. (1966) NATURE (LONDON) 209, 157.

64 - MOSKOWITZ, M. (1964), NATURE (LONDON) 203, 1233.

65 - EAGLE, H. (1959) - SCIENCE, 130, 432.

66 - BARNES, B.G. (1963) in "CYTOLOGIE DE L'ADENOHYPOPHYSE" . Colloque Int. du C.N.R.S., N° 128, p. 91, PARIS.

67 - WATSON, M.L. (1958), J. BIOPHYS. BIOCHEM. CYTOL. 4, 475.

68 - DANIELLI, J.F. (1958), in"SURFACE PHENOMENA IN CHEMISTRY AND BIOLOGY" (JF. DANIELLI et COLL. Eds). Pergamon Press. NEW-YORK.

69 - WEISS, P. (194 1)GROWTH, 5, 163.

70 - TYLER, A. (1946) ,GROWTH SYMPOSIUM, 6 , 17.

71 - MOSCONA, A.A. (1963) - PROC. NAT. ACAD. SCI. WASH. 49, 472.

72 - MARGOLIASH, E., SCHENCK, J.R., HARGLE, M.P., BURGKAS, S., RICHTER, W.R., BARLOW, G.H., et MOSCONA, A.A. (1965). BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM. 20, 383.

73 - STEINBERG, M.S. (1963), EXP. CELL. RES. 30, 257.

74 (CHANOCK, R.M., MUFSON, M.A., JAMES, W.D., FOX, H.H., BLOOM, H.H. et BEN FORSYTH (1962) . PROC. SOC. BIOL. EXP. MED. 110, 543.

75 - TEYSSIE , A. , ROTHSCHILD, L., FEBVRE, H. (1965), CR. ACAD. SCI. PARIS, 261, 4925.

76 - DALES, S. et HOWATSON, A.F. (1962) CANCER RES. 21, 193.

77 - COMAN, D.R. (1944), CANCER RES. 4, 625.

78 - COMAN, D.R. (1961) - CANCER RES. 21, 1436.

79 - WEISS L. (1960), EXP. CELL. RES. , 21, 71.

80 - WEISS, L. (1961), EXP. CELL. RES. 25, 504.

81 - COMAN, DR. (1954), CANCER RES. 14, 519.

82 - DELONG, R.P., COMAN, DR. et ZEIDMAN, I. (1950) - CANCER RES. 3, 718.

83 - EASTY, G.C.et MUTOLO, V. (1960). EXP. CELL. RES. 21, 374.

84 - GASIC, G. et GASIC, T. (1962) - NATURE (LONDON, 196, 170

85 - LANGLEY, O. et AMBROSE, E.J. (1964), NATURE (LONDON) 204, 53.

86 - DODSON, G.O. (1966), NATURE (LONDON) 209, 40.

87 - LEIGHTON, J. (1959) SCIENCE, 129, 466.

88 - WARBURG, O. (1923), BROCHEN Z , 142, 317.

89 - GOLDBERG, E.G. et COLOWICK, S.P. (1965), CANCER RES. 240, 2786.

90 - KALCKAR, H.M. (1964) - NAT. CANCER. INST. MONOG. N° 14, 21.

91 - WEILER , E. (1956) - BRITJ. J. OF CANCER, 10, 553.

92 - NAIRN, R.C., RICHARD, H.C., MC ENTEGARD, M.C. et FOTHERGILL, J.E. (1960)
BRIT. MED. J. 2, 1335.

93 - KAY, HE (1957), BRIT. J. CANCER 11, 409.

94, - EASTY, G.L. et AMBROSE, E.J. (1957). BRIT.J. CANCER, 11, 287.

95 - GREEN, H.N. (1954) - BRIT. MED. J. 2, 1374.

96 - VEERKAMP (J.H.), MUDLER, I. et VAN DEENEN, LLM (1961) ZTSR . KREBS-
FOOSCH, 64, 137.

97 - RAPPORT, M.L., GRAF, L., SKIPSKI, V.P. et ALONZO, N.F. (1959)
CANCER 12, 438.

98 - KASAKI, I? IKODA, I., KATAWI, Y., NAGAWA, S. et SAKA, T.A. (1958)
SCIENCE 127, 1176.

99 - PARDEE, A.B. (1964), NAT. CANCER INST. MONOG. N° 14, P. 7. BETHESDA,

100 - ABERCOMBRIE, M. et HEAYSMAN, JE (1954) - EXP. CELL. RES. 6, 293.

101 - BARSKI, C et BELEHRADEK R. J. (1965) - EXP. CELL. RES. 37, 464.

102 - DEFENDI, V. et GASIC, G. (1963) - J. CELL. COMP. PHYSIOL. 62, 23.

103 - MAC PHERSON, I, et MONTAGNIER, L (1964), VIROLOGY, 23 - 291

104 - DABROWSKA-PIALOWSKA, K (1959), EXP. CELL. RES. 16, 315.

Vu :

LE PRESIDENT :

Professeur J. BERNARD

Vu :

LE DOYEN

Professeur G. BROUET.

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris :

Jean ROCHE.

EDITIONS A.G.E.M.P.
8 RUE DANTE
- PARIS V^e^ -
ODÉ 58-90